



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2013/2014

**Mónia Esperança
Pedrosa**

**EFEITO IMUNOMODULADOR DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS DO ESTROMA EM CÉLULAS T NA
ARTRITE REUMATÓIDE**



**Mónia Esperança
Pedrosa**

**EFEITO IMUNOMODULADOR DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS DO ESTROMA EM CÉLULAS T NA
ARTRITE REUMATÓIDE**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Investigador Auxiliar do Centro Regional do Sangue e Transplantação de Coimbra, Área Funcional da Transplantação do Instituto Português do Sangue e Transplantação, e da Doutora Margarida Sâncio da Cruz Fardilha, Professora Auxiliar Convidada da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais por todo o apoio.

o júri

presidente

Prof. Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor João Eurico Cabral da Fonseca

Médico Reumatologista do Hospital de Santa Maria

Doutor Artur Augusto Paiva

Investigador Auxiliar do Centro Regional do Sangue e Transplantação de Coimbra, Área Funcional da Transplantação do Instituto Português do Sangue e Transplantação

agradecimentos

Agradeço ao Doutor Artur Paiva, pela orientação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À Doutora Cátia pelas amostras dos doentes e à Cell2B pela imensa disponibilidade no envio das células mesenquimais do estroma.

Agradeço à Professora Margarida Fardilha, pela ajuda prestada.

Um muito obrigado à equipa de Citometria de fluxo, em especial à Jú e Susana Pedreiro pela ajuda e sacrifícios e ao Tiago Carvalheiro, pela paciência e apoio mesmo estando longe.

À minha colega de laboratório e colega de casa, Joana Gomes, pela partilha e pelas 24 horas de convivência. E ao Luís pelo carinho, paciência, e apoio permanente nesta fase.

Por último, mas não menos importante, à minha família, em especial aos meus pais e irmã, por todas as oportunidades dadas, pelo apoio, compreensão e preocupação, um muito obrigado.

palavras-chave

Artrite reumatóide, célula T, citocina, células mesenquimais do estroma, imunomodulação, auto-imunidade

resumo

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória, crónica e sistémica que se caracteriza pela formação do *pannus*, tecido inflamatório neoformado com acumulação de células T auto-reativas. Estas células T são responsáveis pelo processo inflamatório através da libertação de citocinas e pela ativação de outras células, como macrófagos e fibroblastos sinoviais (principais produtores de citocinas pró-inflamatórias).

Esta doença tem sido controlada por tratamentos com fármacos anti-reumáticos modificadores da doença que bloqueiam as citocinas inflamatórias, mas mais de 1/3 dos pacientes não respondem aos tratamentos. Assim uma das possíveis formas de tratamento que começa a ser explorada é o uso de células mesenquimais do estroma (MSC).

As MSC são células progenitoras adultas, clonogénicas, não hematopoiéticas e multipotentes, com capacidade de auto-renovação e diferenciação em diversas linhagens celulares, que têm um efeito imunomodulador sobre as células T, inibindo a sua citotoxicidade e promovendo a produção de citocinas anti-inflamatórias, decrescendo a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Assim, este estudo pretende, com a realização de co-culturas entre MSC e células mononucleares, perceber qual o efeito das MSCs em doentes com AR e desta forma encontrar um caminho promissor para o tratamento desta doença autoimune. Os resultados mais relevantes foram a inibição da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de citocinas pró-inflamatórias como, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-9, em todos os compartimentos funcionais, em doentes com AR.

keywords

Rheumatoid Arthritis, T cell, cytokine, mesenchymal stromal cell, immunomodulation, autoimmunity

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory, chronic and systemic disease which is characterized by the formation of pannus, inflammatory tissue neofomed with the amassing of self-reactive T cells. These T cells are responsible for the inflammatory process through the release of cytokines and the activation of other cells, such as macrophages and synovial fibroblasts (the main producers of pro-inflammatory cytokines).

This disease has been controlled by treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs that block the inflammatory cytokines, its effectiveness shows that more than 1/3 of patients do not respond to the treatments. Considering that, one of the possible forms of treatment recently explored, is the use of mesenchymal stromal cells (MSC).

The MSC are adult stem cells with clonogenic capacity, non-hematopoietic and multipotent, with the ability of self-renewal and differentiation into multiple cell lines, which have an immunomodulatory effect on T cells, inhibiting their cytotoxicity and promoting the production of anti-inflammatory cytokines, decreasing the production of pro-inflammatory cytokines.

In conclusion, this study intends to understand the effect of MSCs in patients with RA, by performing co-cultures with MSC and peripheral blood mononuclear cells, aiming to the promising possibility that is the treatment of this autoimmune disease. The most relevant results were the inhibition of the frequency of CD4+ and CD8+ T cells which produces pro-inflammatory cytokines such as IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 and IL-9, in all the functional compartments in patients with RA.

» Índices

Índice de Conteúdos

Índices	i
Introdução	1
1. Sistema Imunitário	3
2. Células do Sistema Imunitário	6
2.1. Linfócitos T.....	7
2.1.1. Linfócitos T auxiliares.....	9
2.1.2. Linfócitos T citotóxicos.....	11
2.1.3. Linfócitos T reguladores.....	12
3. Artrite Reumatóide	13
3.1. Epidemiologia.....	15
3.2. Etiologia.....	15
3.3. Fisiopatologia.....	16
4. Citocinas	18
5. Células Mesenquimais do Estroma	20
5.1. Imunomodulação em linfócitos T e Artrite Reumatóide.....	22
Objetivos	25
Materiais e Métodos	29
1. Amostras.....	31
2. Isolamento de células mononucleares por gradiente de densidade.....	31
3. Co-cultura de MSC derivadas de medula óssea de doadores saudáveis com MNC do sangue periférico.....	32
4. Caracterização funcional das subpopulações de células T e avaliação da produção de citocinas.....	32
5. Aquisição e análise por citometria de fluxo.....	33
6. Separação e purificação das populações celulares Th, Tc e Treg.....	33
7. Análise da expressão génica.....	34
8. Análise Estatística.....	34
Resultados	37

1. Quantificação da frequência de células T CD4⁺ ou CD8⁺ produtoras de citocinas e respectiva expressão (MIF), na ausência e presença de MSC, após estímulo com PMA e ionomicina.....	39
A. Interleucina 2.....	39
B. Interferão- γ	46
C. Fator de Necrose Tumoral- α	54
D. Interleucina 17.....	61
E. Interleucina 6.....	64
F. Interleucina 9	65
2. Estudo da expressão gênica de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺, CD8⁺ e T reguladoras	67
A. Interleucina 10.....	67
B. Fator de Crescimento Transformante- β	69
C. CTLA-4.....	70
D. Interleucina 4.....	72
E. Foxp3.....	73
Discussão.....	75
Conclusão.....	85
Referências Bibliográficas.....	89

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema do princípio de seleção clonal. Durante o processo de geração do repertório linfocitário, algumas células são portadoras de receptores que se ligam a antígenos próprios, sendo eliminadas precocemente durante o desenvolvimento, antes que sejam capazes de responder, assegurando uma tolerância aos antígenos próprios. Quando os linfócitos têm a capacidade de reconhecer apenas os antígenos estranhos ao organismo, esta célula é ativada e começa a dividir-se, originando um clone idêntico, que irá diferenciar-se em células efetoras e de memória.	5
Figura 2 - Esquema da maturação dos linfócitos T.	7
Figura 3 - Esquema simplificado da formação dos linfócitos Th 1 e Th2 a partir de células T CD4+ naïve. Pode-se observar que a IL-12 promove a formação de linfócitos Th1 enquanto a IL-4 permite a diferenciação de linfócitos Th2. Os linfócitos Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-2 e TNF- β e os linfócitos Th2 têm a capacidade de produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, entre outras.	11
Figura 4 - Esquema de uma articulação de um indivíduo saudável em comparação com uma articulação de um indivíduo com artrite reumatóide, onde se pode observar a erosão óssea e a membrana sinovial inflamada e a formação do <i>pannus</i> povoado com várias células do sistema imune.	14
Figura 5 - Consequência da ativação de células T.	17
Figura 6 - Propriedades imunomoduladoras das MSC. Diversos fatores solúveis secretados pelas MSC estão associados às suas características moduladoras sobre linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , células Treg, células NK, células B e células dendríticas.	22
Figura 7 - Fatores solúveis libertados pelas MSC e os seus efeitos nos diversos tipos de célula T.	23
Figura 8 - Representação gráfica da estratégia utilizada para a identificação das diferentes populações de células T e dos seus compartimentos funcionais, mediante a utilização dos anticorpos monoclonais CD3, CD4, CD8, CD27 e CD45RA.	35

Figura 9 - Representação gráfica da frequência de células T CD4 ⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de IL-2, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controle e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respectivas percentagens de inibição.....	41
Figura 10 - Representação gráfica da frequência de células T CD8 ⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de IL-2, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controle e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respectivas percentagens de inibição.....	44
Figura 11 - Representação gráfica da percentagem de inibição de IL-2 das células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ , indivíduo a indivíduo.....	44
Figura 12 - Representação gráfica da MIF de IL-2 pelas I. células T CD4 ⁺ e II. Células T CD8 ⁺ assim como dos seus compartimentos, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controle e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	46
Figura 13 - Representação gráfica da frequência de células T CD4 ⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de IFN- γ , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controle e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respectivas percentagens de inibição.....	49
Figura 14 - Representação gráfica da frequência de células T CD8 ⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de IFN- γ , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controle e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respectivas percentagens de inibição.....	51
Figura 15 - Representação gráfica da percentagem de inibição de IFN- γ das células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ , indivíduo a indivíduo.....	52
Figura 16 - Representação gráfica da MIF de IFN- γ pelas I. células T CD4 ⁺ e II. Células T CD8 ⁺ assim como dos seus compartimentos, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controle e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	54

Figura 17 - Representação gráfica da frequência de células T CD4 ⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de TNF- α , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição.....	56
Figura 18 - Representação gráfica da frequência de células T CD8 ⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de TNF- α , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição.....	58
Figura 19 - Representação gráfica da percentagem de inibição de TNF- α das células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ , indivíduo a indivíduo.....	59
Figura 20 - Representação gráfica da MIF de TNF- α pelas I. células T CD4 ⁺ e II. Células T CD8 ⁺ assim como dos seus compartimentos, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	60
Figura 21 - Representação gráfica da frequência de células T Th17 e Tc17 produtoras de IL-17 e TNF- α , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição.....	62
Figura 22 - Representação gráfica da percentagem de inibição de IL-17 e TNF- α das células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ , do grupo controlo e grupo AR, indivíduo a indivíduo.....	63
Figura 23 - Representação gráfica da MIF de I. IL-17 e II. IL-17 e TNF- α pelas células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	64
Figura 24 Representação gráfica da frequência de células T CD4 ⁺ produtoras de IL-6, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição.....	64
Figura 25 - Representação gráfica da percentagem de inibição de IL-6 das células T CD4 ⁺ do grupo controlo e grupo AR, indivíduo a indivíduo.....	65

Figura 26 - Representação gráfica da frequência de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ produtoras de IL-9, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição.....	66
Figura 27 - Representação gráfica da percentagem de inibição de IL-9 das células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ , do grupo controlo e grupo AR, indivíduo a indivíduo.....	67
Figura 28 - Representação gráfica da expressão de mRNA de IL-10 pelas células T CD4 ⁺ , células T CD8 ⁺ e células T reguladoras, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	68
Figura 29 Representação gráfica da expressão de mRNA de TGF-β pelas células T CD4 ⁺ , células T CD8 ⁺ e células T reguladoras, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	70
Figura 30 Representação gráfica da expressão de mRNA de CTLA4 pelas células T CD4 ⁺ , células T CD8 ⁺ e células T reguladoras, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	71
Figura 31 - Representação gráfica da expressão de mRNA de Il-4 pelas células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ , antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	72
Figura 32 - Representação gráfica da expressão de mRNA de Il-4 pelas células T reguladoras, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC.....	73

Índice de Tabelas

Tabela I - Principais características dos diferentes compartimentos funcionais.....9

Tabela II - Características das principais citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias presentes na AR.....19

Tabela III - Características socio-democráticas e clínicas dos doentes em estudo34

Lista de Abreviaturas

ACPA	Anticorpo Anti Peptídeo Citrolinado
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
AR	Artrite Reumatóide
CD	Célula Dendrítica
CIA	Artrite Induzida por Colagénio
DAMPS	Padrões Moleculares Associados a Perigos
DAS	<i>Score</i> da Atividade da Doença
FR	Fator Reumatóide
GVHD	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
HGF	Fator de Crescimento do Hepatócito
HO	Heme Oxigenase
IDO	Indoleamida 2,3-dioxigenase
IFN	Interferão
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase Induzível
MC	Memória Central
ME	Memória Efetora
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
MNC	Célula Mononuclear
MSC	Célula Mesenquimal do Estroma
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
OLP	Orgão Linfóide Primário
PAMPS	Padrões Moleculares Associados a Patogénios
PGE	Prostaglandina E
PMA	Forbol 12-meristato 13-acetato

SI	Sistema Imunitário
Tc	Linfócito T citotóxico
TCR	Recetor de Célula T
TGF	Fator de Crescimento Transformante
Th	Linfócito T auxiliador
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TLR	Recetores Tipo Toll
Treg	Linfócito T regulador

» Introdução

1. Sistema Imunitário

O sistema imunitário (SI), elemento fundamental na defesa do corpo humano, possui vários mecanismos de defesa que são classificados de acordo com a sua especificidade, apresentando assim uma grande variedade de células, diversos fatores solúveis, como citocinas e seus recetores, e um tecido linfóide com uma organização própria e características específicas. Todos estes componentes permitem uma resposta imunológica efetiva e bem coordenada, consoante a ameaça ao organismo. (1, 2)

A resposta imune pode ser dividida em dois grupos, a imunidade inata ou não específica e a imunidade adaptativa ou específica, dependendo dos mecanismos de defesa.

Quando um invasor rompe a barreira física da pele ou mucosa é “saudado” pelo sistema imune inato – a nossa primeira linha de defesa. É chamado de “inato” uma vez que inclui sistemas de defesa que, na sua maior parte, estão constitutivamente presentes e prontos para serem mobilizados em resposta a uma infeção. (3, 4) Este tipo de sistema não é específico para um antigénio reagindo da mesma maneira para uma variedade de organismos. (5) As células do sistema imune inato reconhecem imunoestimuladores associados aos patogénios, uma vez que estes ocorrem em padrões repetidos, são também conhecidos como padrões moleculares associados aos patogénios (PAMPS, *pathogen-associated molecular patterns*), e também DAMPS (*danger-associated molecular patterns*). Os PAMPS incluem padrões repetidos de estruturas molecular dos ácidos nucleicos, dos lípidos, dos polissacarídeos e das proteínas microbianas que são compartilhadas por várias classes de patogénios e não estão presentes nas células do hospedeiro. (4, 5) Os DAMPS são estruturas encontradas nas células do hospedeiro em *stress* ou mortas. (1)

As células responsáveis pela proteção inata do organismo expressam também recetores de reconhecimento de padrões, os Toll-like Receptors (TLR's), que ativam as vias de sinalização intracelular que levam à secreção de moléculas sinalizadores extracelulares, responsáveis por identificar microrganismos em diferentes localizações celulares, que promovem a inflamação e auxiliam na ativação da resposta imune adaptativa. (3, 5)

Por sua vez, o sistema imune adaptativo requer algum tempo para reagir contra um organismo invasor, sendo considerado a segunda linha de defesa. (1) A resposta adaptativa

é altamente específica para um antígeno e reage somente contra o antígeno que induziu a resposta, gerando proteção por longos períodos. Por fim o sistema adaptativo, ao contrário do sistema imune inato, apresenta memória imunológica. A exposição do sistema imunitário a antígenos estranhos aumenta a sua capacidade para responder de novo a esse antígeno, sendo a resposta às seguintes exposições mais rápida e eficiente. (1) A memória imunológica ocorre parcialmente porque cada exposição ao antígeno expande o clone de linfócitos para um antígeno específico. A estimulação de linfócitos naive por antígenos gera células de memória de longa vida e estas células apresentam características que as tornam mais eficientes na resposta e eliminação do antígeno do que os linfócitos naive.(3, 6)

A principal função do sistema imune é a discriminação do próprio/não próprio. Desde o nascimento, o nosso sistema imune inato é constantemente bombardeado com antígenos próprios, antígenos inoculados e patógenos exteriores. Para se manter saudável, este deve manter o balanço entre a capacidade de responder a agentes infecciosos e de sustentar a auto-tolerância. A ausência de resposta adequada submete o indivíduo aos efeitos deletérios da invasão por patógenos, ao passo que o sistema imune respondendo de modo exacerbado pode gerar respostas inflamatórias prejudiciais. (7)

Para desempenhar uma função protetora adequada, os múltiplos clones de células T passam por um rigoroso processo de seleção e maturação tímica que se dá mediante o reconhecimento de peptídeos próprios ligados a moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) (figura 1). (1)

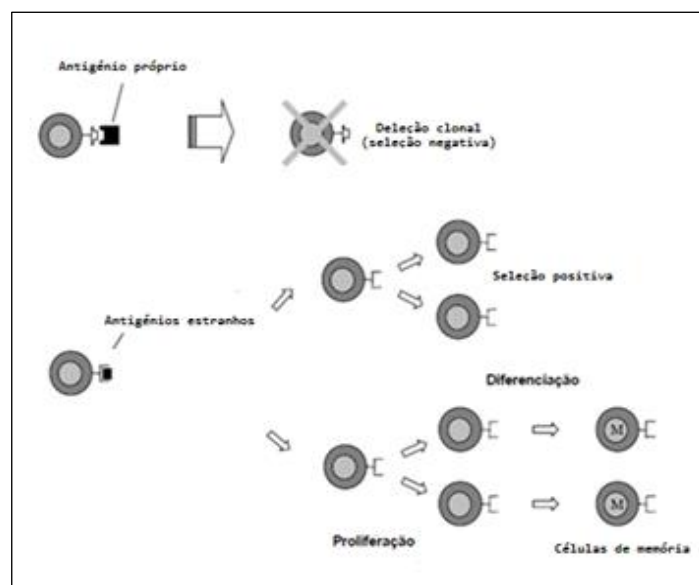


Figura 1 Esquema do princípio de seleção clonal. Durante o processo de geração do repertório linfocitário, algumas células são portadoras de receptores que se ligam a antígenos próprios, sendo eliminadas precocemente durante o desenvolvimento, antes que sejam capazes de responder, assegurando uma tolerância aos antígenos próprios. Quando os linfócitos têm a capacidade de reconhecer apenas os antígenos estranhos ao organismo, esta célula é ativada e começa a dividir-se, originando um clone idêntico, que irá diferenciar-se em células efetoras e de memória. Adaptado de (10)

O MHC pode ser dividido em quatro subconjuntos de genes ou classes: I, II, III e IV, estando os de classe I e II ligados ao processamento e apresentação de antígenos, enquanto os genes que compõem as classes III e IV codificam para outras proteínas. Em humanos, existem três *loci* principais que codificam as moléculas de classe I, denominados de HLA-A, HLA-B e HLA-C, e três *loci* principais do MHC classe II, que são denominados HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. (8)

As moléculas do MHC de classe I, que estão presentes na maioria das células nucleadas, são reconhecidas principalmente pelo TCR de linfócitos T CD8, ao passo que as moléculas de MHC de classe II, presentes principalmente na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC), são reconhecidas pelo TCR dos linfócitos T CD4. (8)

O timo é composto por uma grande quantidade de APCs, incluindo macrófagos, células dendríticas (CD) e células epiteliais especializadas. Este órgão é também protegido por uma barreira sanguínea que, numa primeira estância, possibilita a apresentação de complexos MHC-próprio/peptídeo por parte das APCs ao repertório de células T que se está a formar. (1)

A seleção tímica resulta da interação das células T imaturas (timócitos) com as moléculas do MHC do próprio expressas pelas células APC's dentro do timo, resultando na morte (deleção clonal) daquelas células T que forem auto-reativas, o que significa, não reconhecem os antígenos como próprios. O tempo e a extensão deste processo de deleção dependem da afinidade da ligação do TCR ao complexo MHC+peptídeo. (4)

As células T que se ligam aos antígenos próprios com alta afinidade são deletadas precocemente e de forma mais efetiva do que aquelas que se ligam com baixa afinidade. A esta eliminação de células T auto-reativas dá-se o nome de seleção negativa, um mecanismo importante para a manutenção da tolerância a vários antígenos do próprio, que

é designado de *tolerância central*. Assim, é necessário selecionar as células T cujos recetores são capazes de reconhecer e realizar a ligação às moléculas do MHC. Este processo envolvido na preservação de especificidades úteis é denominado de seleção positiva. Na linhagem T, a seleção positiva assegura a maturação de células T cujos recetores se ligam com baixa afinidade a moléculas do MHC. As células T maduras cujos precursores foram positivamente selecionados por moléculas do MHC no timo são capazes de reconhecer peptídeos antigénicos estranhos apresentados pelas mesmas moléculas nas APC's nos tecidos periféricos. A seleção positiva fornece sinais de sobrevivência aos linfócitos T e B que arranjam apropriadamente os seus recetores de antigénios. Assim, esta seleção dos linfócitos T permite que o sistema imunológico seja capaz de se auto reconhecer. (1, 3, 5)

Desta forma, todas as células T devem reconhecer antigénios associados a moléculas de MHC de próprio que formam os complexos MHC/peptídeo, ou MHC-próprio/peptídeo. (1)

Esta capacidade de distinção entre antigénios próprios e não-próprios é definida como tolerância imunológica, sendo fundamental para evitar o auto-reconhecimento, que provocaria respostas autoimunes patológicas. (7, 9)

2. Células do Sistema Imunitário

Todas as células do sistema imune têm origem na medula óssea, de uma célula estaminal hematopoiética, que origina duas linhagens principais, uma de células mieloides progenitoras, de onde são formadas células mieloides (monócitos, eritrócitos, granulócitos e CDs mielóides) e uma de células linfóides progenitoras que originam células linfóides (células T, células B, células natural killer (NK) e CDs plasmocitóides) (10)

As células mielóides e as células NK fazem parte do sistema imune inato, e como referido anteriormente, os recetores destas células são recetores de padrões de reconhecimento que identificam padrões moleculares gerais encontrados nos patógenos. Já as células T e B fazem parte do sistema imune adaptativo, e estas últimas, após a exposição ao antigénio podem-se diferenciar em plasmócitos, cuja função primária é a produção de anticorpos, e no caso dos linfócitos T, ocorrer diferenciação em células T citotóxicas (Tc) ou células T auxiliaadoras (Th). (10, 11)

As CD e os monócitos fazem parte de uma subdivisão especializada, as APCs, que têm um papel importante na imunidade inata e agem como um conector para o sistema imune adaptativo ao participar na apresentação de antígenos e na ativação das células Th. Uma característica destas células é a expressão de moléculas de MHC de classe II à superfície. (1)

2.1. Linfócitos T

Os linfócitos T são as principais células intervenientes na imunidade celular que reconhecem uma ampla variedade de antígenos específicos. (9)

O desenvolvimento dos linfócitos T *alfa beta* ($\alpha\beta$) e *gamma delta* ($\gamma\delta$) segue estadios sequenciais, consistindo na recombinação somática e na expressão dos genes do recetor de células T (TCR) para o antígeno, proliferação celular, seleção induzida pelo antígeno e aquisição de fenótipos de capacidade funcional. (8)

Estas células têm origem na medula óssea e completam o seu desenvolvimento no timo, sendo denominadas de timócitos. (11) Os timócitos mais imaturos não expressam TCR nem co-recetores CD4 ou CD8, sendo encontrados na região cortical do timo. A partir daqui, os timócitos migram para e através do córtex, onde a maior parte dos eventos de maturação subsequente ocorrem. É no córtex que estas células expressam pela primeira vez TCRs $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$, e as células T $\alpha\beta$ começam a diferenciarem-se em células T CD4⁺ restritas a MHC classe II ou CD8⁺ restritas a MHC classe I. (12) (figura 2)

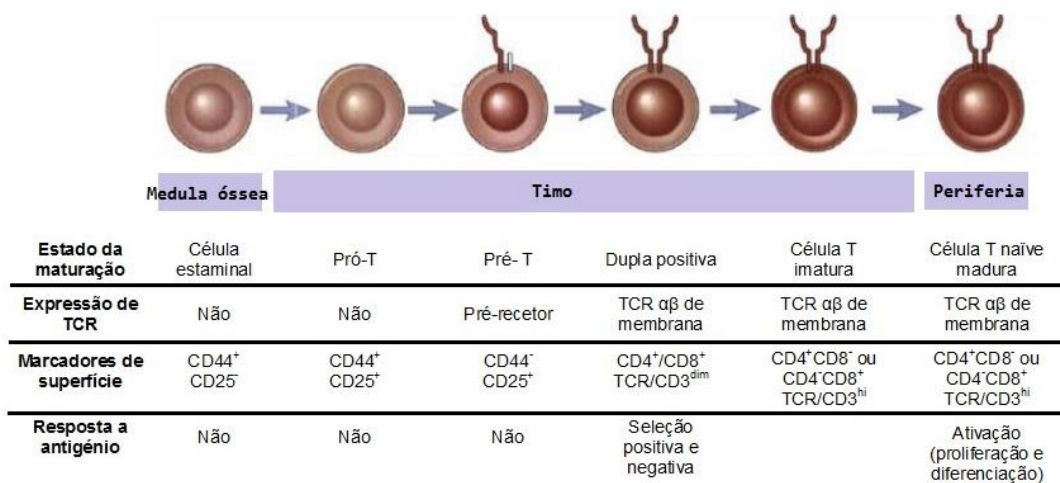


Figura 2 Esquema da maturação dos linfócitos T. Adaptado de (1)

Os TCRs são glicoproteínas heterodiméricas, localizadas na superfície das células, associadas a um complexo denominado CD3, que reconhecem os antígenos após o seu processamento, sendo a sua apresentação feita pelas APCs. O CD3, por sua vez, é responsável pela sinalização celular subsequente. (5, 9)

Este receptor reconhece somente o antígeno proteico quando associado a uma molécula de MHC. Para que isto ocorra, é necessário que o antígeno seja degradado enzimaticamente e algum dos peptídeos resultantes se ligue a uma molécula de MHC. Existindo duas vias básicas de processamento: a endógena e a exógena. (1, 3, 4)

Na via endógena as proteínas produzidas no citoplasma celular são degradadas por proteases presentes no proteossoma. Os fragmentos gerados são transportados para o interior do retículo endoplasmático (RE), formando-se um complexo estável dos peptídeos formados com as moléculas do MHC de classe I sendo de seguida transportados para a superfície da célula. A apresentação por MHC de classe I é feita por todas as células nucleadas do organismo para os linfócitos T CD8⁺. (1, 4)

Na via exógena, os antígenos extracelulares são endocitados ou fagocitados e a vesícula resultante funde-se ao lisossoma, onde se forma o endossoma, permitindo que os antígenos sejam degradados enzimaticamente. Simultaneamente, as cadeias α e β da molécula do MHC de classe II juntamente com a cadeia invariante são sintetizadas no RE e transportadas para o aparelho de golgi com o objetivo de chegarem ao endossoma, onde esta última cadeia é digerida. Os fragmentos proteicos juntam-se então à molécula do MHC de classe II e são transportados para a superfície da célula. Esta via é feita apenas por APCs para os linfócitos T CD4⁺. (1, 4)

A ativação específica e a diferenciação de células T naïve resultam na geração de uma variedade de fenótipos de células T que podem ser definidos pela aquisição de um perfil característico de citocinas e mecanismos citolíticos. (3) Esta ativação ocorre nos órgão linfóides secundários, onde os linfócitos T naïve se encontram alojados, esperando encontrar antígenos apresentados por CDs maduras em moléculas MHC classe I ou classe II para serem ativados. Isto resulta na expansão da pool de linfócitos específicos para um antígeno e na diferenciação destas células em linfócitos efetores e de memória. Algumas destas células T ativadas deixam os órgãos linfáticos onde a ativação ocorreu e entram na circulação. Outras células T CD4⁺ ficam no órgão linfático ajudando na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. (4, 11)

Uma pequena porção destas células, na sequência da resposta imune adaptativa, persiste como célula T de memória, e têm a capacidade de responder de uma forma mais rápida e potente contra uma segunda exposição ao antígeno. (4)

Na tabela abaixo podem-se observar as características destes diferentes compartimentos funcionais:

Tabela I Principais características dos diferentes compartimentos funcionais (13, 14)

	Naïve	Memória Central	Memória Efetora	Efetora
Características	<ul style="list-style-type: none"> • Célula que não está polarizada para uma função • Linfócito quiescente, lento a responder 	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de meia vida longo • Geradas em fases posteriores da resposta imunológica 	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de meia vida curto • Gerado na fase inicial da resposta imunológica • Aumentam a capacidade de homing 	<ul style="list-style-type: none"> • Células já diferenciadas • Produção de citocinas

2.1.1. Linfócitos T auxiliares

Esta célula é o “mensageiro” mais importante do sistema imunitário, sendo responsável por enviar estímulos para os diversos leucócitos a fim de estes realizarem um conflito imunológico contra o agente agressor. (4)

Estas células possuem um complexo TCR/CD3 e um co-recetor CD4 na superfície, que permite reconhecer o epítipo que lhe é apresentado pelas APC. (3)

As células T auxiliares têm uma função reguladora e servem principalmente para estimular o crescimento e diferenciação de linfócitos T citotóxicos e T reguladores contra o antígeno, estimular o crescimento e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e ativar os macrófagos e têm também uma função de auto-estimulação, ou seja, um determinado linfócito T auxiliar pode estimular o crescimento de toda a população de linfócitos T auxiliares. (3, 4, 14)

Os linfócitos Th são subdivididos funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem. Durante o estímulo fornecido por uma APC, um linfócito precursor Th0 pode

diferenciar-se em Th1 ou Th2, na dependência do ambiente de citocinas presente. (14) Por exemplo, alguns antígenos estimulam a produção de IL-4 o que favorece a diferenciação de células Th2 enquanto outros antígenos estimulam a produção de IL-12, que favorece a formação de células Th1 (figura 3). (3, 14)

As células Th1 produzem grandes quantidades de interleucina-2 (IL), que induz a proliferação de linfócitos T (incluindo os próprios linfócitos T auxiliares) e afeta os linfócitos T CD8, induzindo a sua proliferação e um aumento da sua capacidade citotóxica. Outra das citocinas produzida em grandes quantidades é o interferão- γ (IFN), uma citocina com elevada importância na ativação de macrófagos infetados com patógenos intracelulares e na ativação de linfócitos T CD8. Esta citocina promove também um ciclo de feedback positivo induzindo a sua polarização para a via de diferenciação Th1 e inibindo a via Th2. (3, 4, 9) A resposta Th1 é essencial para o controlo de patógenos intracelulares.

Por sua vez, o linfócito Th2 produz as interleucinas 4, 5, 6, 9 e 10, estando a IL-4 e a IL-10 relacionadas com uma resposta imunitária humoral. A IL-4 induz também a troca de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B e a IL-5 induz a produção e ativação de eosinófilos. De forma análoga ao INF- γ , a IL-4 também promove o feedback positivo para a via Th2 e suprime a via Th1. (3, 9)

As citocinas Th2 têm sido consideradas protetoras, portanto a procura pela alteração no padrão de resposta imune de Th1 para Th2 tem sido muito estudada, visando a melhora ou o restabelecimento da tolerância imunológica. (11)

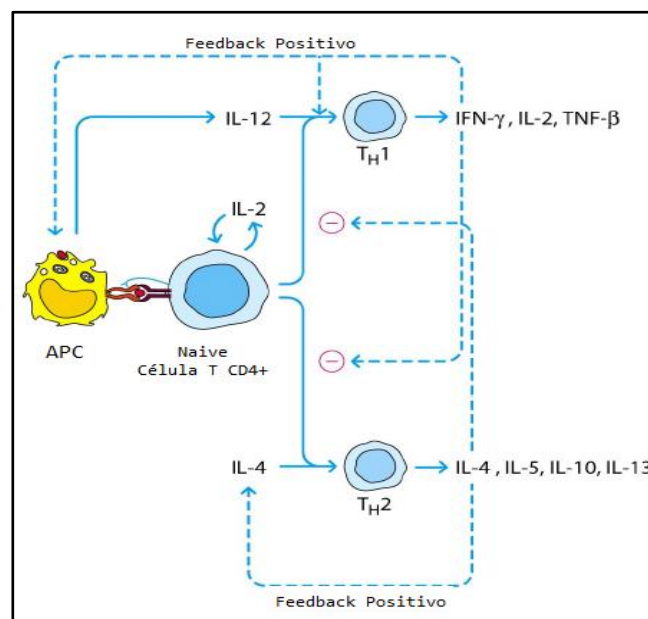


Figura 3 Esquema simplificado da formação dos linfócitos Th 1 e Th2 a partir de células T CD4+ naïve. Pode-se observar que a IL-12 promove a formação de linfócitos Th1 enquanto a IL-4 permite a diferenciação de linfócitos Th2. Os linfócitos Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-2 e TNF- β e os linfócitos Th2 têm a capacidade de produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, entre outras. Adaptado de (16)

Mais recentemente uma nova subpopulação de linfócitos T, os Th17, tem sido responsabilizada pelo processo fisiopatológico de doenças autoimunes. (15)

Estas células diferenciam-se a partir de células T naïve em resposta ao fator de crescimento transformador β (TGF- β), em combinação com outras citocinas pró-inflamatórias como, IL-6, IL-21 e IL-1, enquanto a IL-23 promove a sua expansão e sobrevivência. (4, 15, 16) As citocinas produzidas por estes linfócitos são as IL-22, IL-26 e citocinas da família da IL-17. As citocinas da família IL-17 são fortes indutoras da inflamação, induzindo a infiltração celular e produção de outras citocinas pró-inflamatórias. (11) A citocina característica desta célula, a IL-17, resulta no recrutamento de neutrófilos para o local de infecção. Estes neutrófilos ajudam na defesa contra patógenos extracelulares contra os quais as células Th1 e Th2 são relativamente ineficazes. (4)

Existe também outra classe de células Th independentes, as Th9, que produzem elevados níveis de IL-9 e IL-10. Parece que estas células estão envolvidas na resposta contra helmintos e a nível alérgico, e têm sido envolvidas em várias doenças inflamatórias, sendo necessários mais estudo para esclarecer melhor quais as suas funções. (17)

2.1.2. Linfócitos T citotóxicos

Os linfócitos T citotóxicos possuem um complexo TCR/CD3 e um co-recetor de membrana CD8, que têm a função de reconhecer a classe I do MHC, que são expressas por praticamente todas as células nucleadas. (3, 14)

Uma vez ativados por uma APC, os linfócitos Tc tornam-se células efectoras, que podem matar qualquer célula-alvo que expressa o mesmo antígeno. (5)

Estas células desempenham a sua função lítica através de duas estratégias.

A primeira, pela libertação de dois tipos de citotoxinas, perforina, uma proteína que se polimeriza na membrana plasmática da célula-alvo para gerar canais transmembranares, e a granzima B, que penetra na célula através dos poros formados. (1)

Esta citotoxina liberta o citocromo c da mitocôndria, ativando a cascata proteolítica das caspases que matam a célula por apoptose. (5)

Na segunda estratégia, a célula Tc ativa a cascata de caspases indiretamente, através de uma proteína presente na sua superfície, denominada de Fas ligando, que se liga a proteínas recetoras transmembranares na célula-alvo denominadas de Fas. Esta ligação promove o recrutamento da procaspase-8, que fica ativada e inicia a cascata de caspases e consequentemente a apoptose celular. (5)

É de destacar que a função dos linfócitos T CD8⁺ não se limita a eliminar células-alvo, estas células também participam noutros mecanismos de defesa do organismo, nomeadamente através da produção de citocinas, entre as quais o IFN- γ . (3)

O IFN- γ tem a capacidade de inibir diretamente a replicação viral, de ativar macrófagos aumentando a sua capacidade citotóxica e de apresentação de antígenos e pode ainda induzir a síntese de moléculas de MHC de classe I assim como de outras proteínas envolvidas na apresentação de antígenos. (14)

2.1.3. Linfócitos T reguladores (Treg)

Nos últimos anos têm vindo a acumular-se evidências sobre a existência de uma subpopulação de linfócitos T, designados de linfócitos T reguladores (Treg). Estas células exercem efeitos imunossupressores potentes através do contacto célula a célula e pela produção de fatores solúveis, regulando negativamente a ativação de cada um dos subtipos principais de células Th, bem como outras células do sistema imune e inflamatório. (18)

Correspondem a menos de 10% das células T na circulação sanguínea e dos órgãos linfóides periféricos (OLP), mas apresentam um papel fundamental na tolerância imune, inibindo a atividade de linfócitos Tc e Th autorreativos e previnem uma resposta excessiva por parte das células T a antígenos microbianos nas infeções crónicas. (5)

A característica que melhor define esta população é a expressão do fator de transcrição Foxp3, o qual atua como um marcador único dessas células e é o controlador do seu desenvolvimento. (5, 19)

Assim sendo os linfócitos Treg podem ser divididos em dois tipos: naturais e induzidos. (19)

Os linfócitos Treg naturais têm origem no timo, migrando de seguida para os tecidos e órgão periféricos, onde funcionam como supressores da atividade efetora de potenciais linfócitos T autorreativos. Estas células expressam níveis elevados inalteráveis de CD25, sendo o seu fenótipo $CD4^+/CD25^{++}/Foxp3^+$. As células Treg naturais não proliferam em resposta a estímulos externos, sendo a sua capacidade imunossupressora executada através de contacto celular com linfócitos T autorreativos. (10, 19)

Os linfócitos Treg induzidos, são gerados a partir da estimulação da via TCR/CD3, na presença de IL-10, TGF- β e IFN- α . Estas células têm também a sua origem no timo mas sofrem um processo de diferenciação adicional na periferia que lhes confere a capacidade imunossupressora em determinadas condições microambientais. (10, 17, 19, 20)

As Tregs induzidas por IL-10 têm o fenótipo $CD4^+/CD25^{++}/Foxp3^-$ e têm a capacidade de suprimir as respostas imunes pela secreção de IL-10, enquanto as Treg induzidas por TGF- β são $CD4^+/CD25^{++}/Foxp3^+$ e suprimem pela secreção de TGF- β . (5, 10, 20)

Assim, os linfócitos Treg constituem uma população linfocitária cuja função é suprimir respostas imunitárias mediadas por linfócitos T efetores autorreativos, quer em situações não inflamatórias, no caso dos Treg naturais, quer em situações inflamatórias associadas a infeções e transplantes. (18, 19)

Quando estas células seguem todos os padrões de formação adequados, a diversidade de fenótipos permite uma proteção imunitária contra múltiplos microrganismos patogénicos, mantendo a auto-tolerância e a homeostasia. Por outro lado, quando os linfócitos T têm uma resposta pro-inflamatória exuberante é despoletada a origem de auto-imunidade e doenças alérgicas. (4, 14, 18)

3. Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune inflamatória, crónica e sistémica. Esta doença manifesta-se por uma poliartrite simétrica persistente (sinovite), que afeta mãos e pés, embora qualquer articulação revestida por uma membrana sinovial possa estar envolvida (figura 4). (21-23)

Outras características associadas à AR são a dor, inchaço e progressiva destruição de pequenas articulações, acompanhado por uma incapacidade funcional. (21, 22) Geralmente, adicionados a estas características coexistem também sintomas sistêmicos, como a fadiga, febre, anemia e limitações nas atividades diárias, tendo esta doença um curso crônico com períodos variáveis de remissão e agravamento. (24)

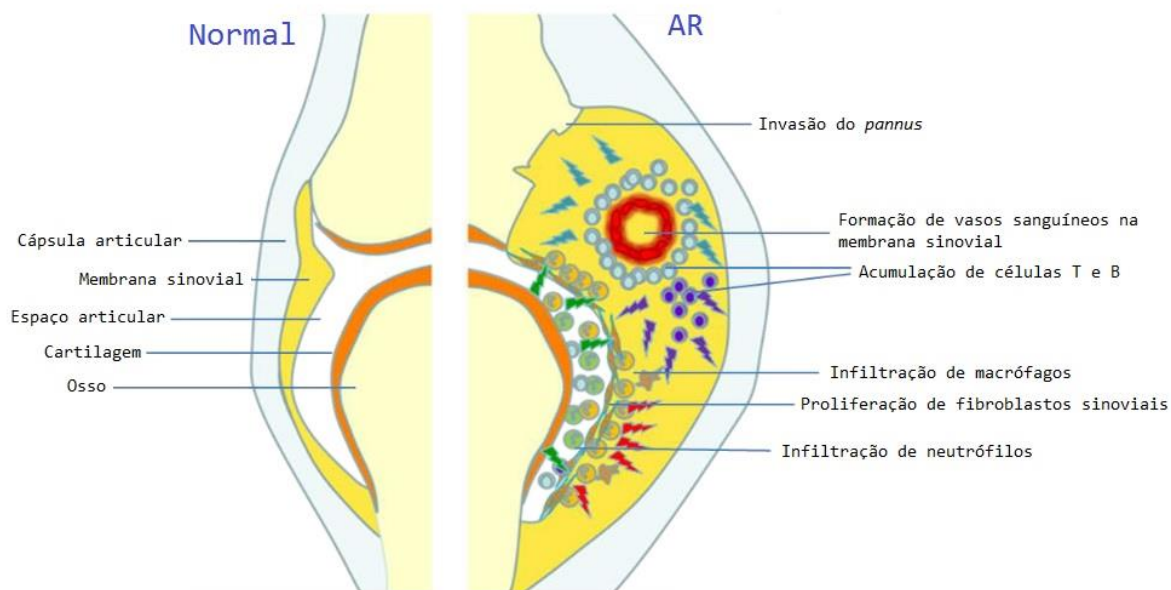


Figura 4 Esquema de uma articulação de um indivíduo saudável em comparação com uma articulação de um indivíduo com artrite reumatóide, onde se pode observar a erosão óssea e a membrana sinovial inflamada e a formação do *pannus* povoado com várias células do sistema imune. (9)

Para a quantificação e avaliação da evolução clínica da AR, de forma a ser facilmente objetivável e reproduzível, foram desenvolvidos vários instrumentos metrológicos, entre os quais, os critérios de resposta do Colégio Americano de Reumatologia (ACR), um *score* de atividade da doença (DAS). (25)

O índice DAS é de fácil utilização e percepção, e para o seu cálculo são usadas 4 variáveis: número de articulações dolorosas e tumefactas, o valor da velocidade de sedimentação em mm/h e o grau de comprometimento causado pela doença. Avalia 28 articulações, sendo então designado por DAS28. (26)

A avaliação da atividade clínica usando este método define que há remissão da AR quando a sua pontuação é inferior a 2,6, atividade ligeira de 2,6 a 3,2, atividade moderada

de 3,2 a 5,1 e atividade intensa acima de 5,1. A pontuação máxima do índice DAS28 é 10. (26)

3.1. Epidemiologia

A AR tem uma incidência de 1% na população mundial, não existindo evidências de uma distinção preferencial de áreas geográficas ou grupos étnicos. (27) Embora possa ter início em qualquer idade, o grupo mais afetado é o das mulheres entre os 35-50 anos, sendo afetadas cerca de 3 vezes mais que os homens. (28)

Parentes de primeiro grau de indivíduos com AR têm 2 a 3 vezes maior risco para a doença. A concordância da doença em gêmeos monozigóticos é de aproximadamente 15-20%, o que sugere que fatores não genéticos têm um papel importante. (29, 30)

3.2. Etiologia

A causa da ocorrência da AR é ainda desconhecida, mas fatores genéticos, hormonais, imunológicos e infecciosos podem desempenhar um papel significativo enquanto fatores psicológicos e ambientais podem influenciar a evolução da doença. (29)

Os fatores genéticos estão associados a 60% do risco de contrair a doença, enquanto 40% do risco está ligado a fatores ambientais.

A região do genoma com maior importância para estudos de AR é o *locus* do MHC que é responsável por 30% a 50% da suscetibilidade genética para a AR, onde o alelo HLA-DR β 1 está intimamente ligado com a presença de dois anticorpos, o fator reumatóide (FR) e o anticorpo anti peptídeo citrolinado (ACPA). (29) Estes anticorpos reagem contra auto-antígenos fora das articulações e podem ser determinantes para uma detecção precoce da doença, uma vez que se podem desenvolver até 10 anos antes da mesma. (31)

Um grande avanço na descrição das interações entre genes e ambiente foi aquando da observação do tabagismo como fator de risco para a AR. O risco de desenvolvimento da doença é 21 vezes superior em indivíduos fumadores com a presença de ACPA. (30)

A iniciação da AR é portanto uma combinação de eventos pré-determinados (genéticos) e aleatórios onde a sua suscetibilidade esta claramente definida por um padrão

de genes herdados, como o HLA. Influências epigenéticas, como hipometilação de DNA ou expressão de microRNAs, também pode aumentar a expressão de genes pró-inflamatórios. (28, 29) Contudo os genes não são a única influência, uma vez que a taxa de concordância entre gêmeos idênticos é de apenas 15% a 20% e estímulos ambientais, como fumar, podem interagir com os genes, aumentando a suscetibilidade de 20% a 40%. (28)

3.3. Fisiopatologia

A fisiopatologia da AR não é completamente compreendida. Um estímulo externo, como por exemplo, fumo de cigarro, infecção ou trauma, em indivíduos geneticamente suscetíveis, pode desencadear uma reação autoimune, que conduz à hipertrofia sinovial e inflamação das articulações. (27, 29)

Segue-se então a indução de uma resposta imunológica, que resulta na inflamação do revestimento da articulação (membrana sinovial). A membrana sinovial é uma estrutura relativamente acelular com a presença de macrófagos e células semelhantes a fibroblastos conhecidas como sinoviócitos. (22) Na AR, o revestimento torna-se hiperplásico, devido a infiltração e proliferação de células autorreativas (entre as quais, células T), passando a designar-se de *pannus*. (22, 24)

O primeiro evento nesta estimulação do processo inflamatório parece ser a apresentação de um peptídeo previamente processado e ligado à molécula HLA-DR β 1, por parte das células apresentadoras de antígenos, ao linfócito T CD4⁺. (29)

Forma-se então um complexo trimolecular fazendo com que a célula Th altere as suas características fenotípicas e passe a libertar IL-2 e IFN- γ , passando a ser denominada de Th1. Estas células vão então ativar os macrófagos e outras células, incluindo fibroblastos sinoviais (principais produtores de TNF- α e IL-1) (figura 5). (24)

As células T são os principais mediadores do desenvolvimento da AR, estas células, como referido anteriormente, podem interagir com outros tipos celulares perpetuando a inflamação. (32) Historicamente a AR é considerada uma doença com perfil exacerbado de resposta imunológica do tipo Th1, no entanto, é baseada num desequilíbrio entre Th1/Th2, ou seja, um desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias. (21, 30)

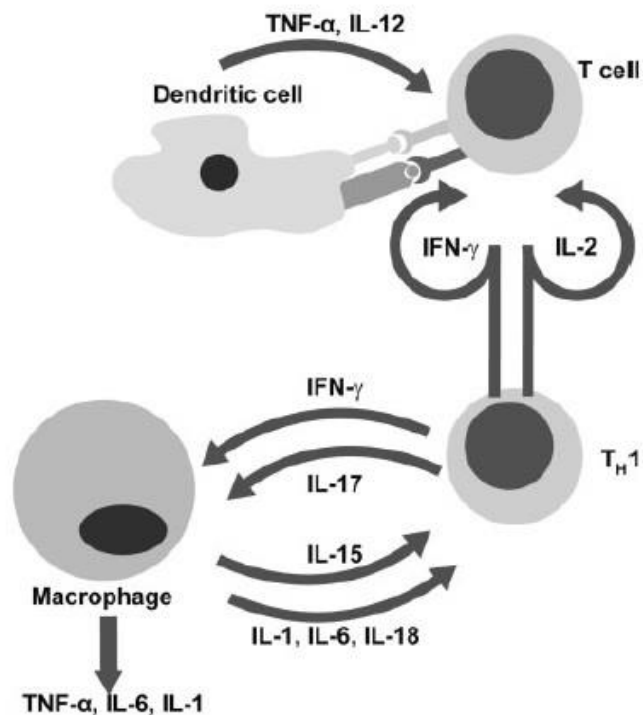


Figura 5 Consequência da ativação de células T (31)

Já está bem estabelecido que as citocinas pró-inflamatórias, especialmente o fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1 e IL-6, estão envolvidas na patogênese da AR. (33, 34)

O TNF- α é considerado o desencadeador de eventos pró-inflamatórias devido à sua capacidade de induzir a produção de outras citocinas, como a IL-1, IL-6 e IL-8, frequentemente encontradas nas articulações de pacientes com AR. (35) Para além desta capacidade, o TNF- α favorece a libertação de metaloproteínas de matriz, que promovem a destruição tecidual e induz a expressão de moléculas de adesão, que facilitam a infiltração de células inflamatórias na membrana sinovial. (21, 33)

Estudos recentes têm sugerido que as células Th17, produtoras de IL-17, são um novo subgrupo de células críticas para a patogênese da AR. (36) A diferenciação em Th17 é dirigida principalmente pela ação do TGF- β . (15, 37) A IL-17, citocina produzida por estas células, induz a produção de mais citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , apresentando um papel patogénico devido à sua associação com a destruição óssea. (36)

Por outro lado, embora pouco presentes, estão as células Treg. Estas células suprimem respostas de células T CD4⁺ e CD8⁺ através do contato célula-célula, secreção de citocinas e fatores inibitórios citotóxicos, ou através da modulação de APCs, apresentando um papel fundamental na manutenção da tolerância periférica. (19, 37)

Há indícios de que a função das células Treg esteja prejudicada devido a expressão reduzida de CTLA-4, uma molécula supressora, e devido à presença de citocinas como, por exemplo, o TNF- α . (38, 39)

As citocinas formam uma rede complexa e redundante, cujo balanço final depende de múltiplas interações. Em relação à inflamação, o resultado será a progressão ou a resolução do processo inflamatório. Assim, nenhuma das citocinas tem um único sentido e nenhuma das fases do processo inflamatório depende de uma única citocina. (3, 30)

A inflamação que caracteriza a AR é predominantemente caracterizada por efeitos das citocinas pró-inflamatórias que se sobrepõem as citocinas anti-inflamatórias. (30)

Nos últimos 20 anos, a atividade da doença tem sido controlada por tratamentos com fármacos anti-reumáticos modificadores da doença que bloqueiam as citocinas inflamatórias tal como o TNF- α . Apesar disso, esta medicação não é efetiva em todos os pacientes com AR, com mais de 1/3 dos pacientes a não responderem aos tratamentos. (34)

Assim, uma das possíveis formas de tratamento que começa a ser explorada é o uso de células mesenquimais do estroma (MSC) devido às suas propriedades imunomoduladoras. (40)

4. Citocinas

As citocinas são proteínas que têm a função de regular a duração e a intensidade das respostas imunes específicas, recrutar células efetoras para as áreas de inflamação e induzir a geração e maturação de novas células a partir dos seus precursores. Podem ser sintetizadas por macrófagos, monócitos e, principalmente, pelos linfócitos, entre outras células. (1, 3)

A ação destas proteínas é pleiotrópica, pois podem estimular vários tipos de células, e redundante, quando duas ou mais citocinas podem apresentar a mesma ação. Para além disso, podem também afetar a ação de outras citocinas de forma antagónica ou sinérgica. (1, 10)

As citocinas também podem ser classificadas de acordo com a função que desempenham na resposta imune, sendo então divididas em mediadoras da imunidade inata, onde estimulam os macrófagos e células NK; mediadoras da imunidade adquirida, quando ativam linfócitos T; e quimiocinas, que são responsáveis pela migração de leucócitos para os locais de infecção, e por fim estimuladoras da hematopoiese. (3, 4)

Na tabela II estão reunidas as citocinas e as suas características com maior influência na AR, tanto a nível inflamatório como anti-inflamatório, libertadas pelos linfócitos T.

Tabela II Características das principais citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias presentes na AR

Características		
Citocinas pró-inflamatórias	TNF-α	Na AR, está relacionada com a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e pela modulação de células Treg.
	IFN-γ	Regula a ativação de macrófagos e células NK; estimula a secreção de imunoglobulinas; promove a diferenciação de células Th1.
	IL-1	Promove a ativação de leucócitos, células endoteliais, osteoblastos e condrócitos.
	IL-2	Indução da ativação e proliferação de células T e B; estimulação da citotoxicidade das células NK; expansão clonal dos linfócitos Tc.
	IL-6	Promove a diferenciação e crescimento de células T, células B e osteoblastos
	IL-9	Estimula a proliferação celular; previne a apoptose.
	IL-17	Indutoras da inflamação, promovendo a infiltração celular e produção de outras citocinas pró-inflamatórias
Citocinas anti-inflamatórias	TGF-β	Inibe a proliferação de células T; bloqueia os efeitos das citocinas pró-inflamatórias; inibe a ativação de macrófagos.
	IL-4	Estimula a diferenciação e proliferação de linfócitos Th2; tem anti-inflamatória em células T e monócitos
	IL-10	Inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias; estimula a proliferação de mastócitos; inibe a diferenciação de células Th1; inibe a função de células NK

5. Células Mesenquimais do Estroma

As MSCs são células estaminais adultas e morfologicamente fusiformes, formato semelhante a fibroblastos, e apresentam como característica, no seu período inicial de expansão *in vitro*, a propriedade de formação de unidades formadoras de colônias de fibroblastos. (41)

Segundo o Comitê de Células Estaminais Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular as MSC, apresentam três características, sendo elas: [1] capacidade de aderência ao plástico; [2] ausência de marcadores hematopoiéticos, tais como CD14, CD45, CD34, CD133 e HLA-DR e expressão de moléculas de superfície celular CD44, CD90, CD73 e CD105; [3] capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares como, osteoblastos, condroblastos e adipócitos. (42, 43) Possuem também a capacidade de auto-renovação e de proliferação numa colônia de células geneticamente idênticas. (40)

Estas células representam uma fração muito pequena da população total de células nucleadas da medula óssea (0.001% a 0.01% das células totais) podendo ser isoladas e expandidas com eficiência *in vitro*, a partir de diversos tecidos adultos. (42) Normalmente, as MSC são isoladas a partir do aspirado de medula óssea por um gradiente de densidade e separadas das células estaminais hematopoiéticas pela sua capacidade de aderência a superfícies plásticas em placas de cultura celular. (43) Mas podem também ser isoladas a partir do sangue e matriz do cordão umbilical, do tecido adiposo entre outros. (44)

Além da reparação de tecidos, as MSC mostraram recentemente efeitos anti-proliferativos e anti-inflamatórios potentes, após a observação de que as MSCs derivadas de medula óssea suprimiam a diferenciação e proliferação de células T. (45, 46)

Estes estudos redirecionaram a atenção dos cientistas para a multipotencialidade das MSC em relação aos seus possíveis efeitos regulatórios sobre as células do sistema imunológico e possibilitaram a caracterização da elevada atividade imunomoduladora. (45) Apesar deste elevado número de estudos, os mecanismos por detrás desta atividade ainda não são totalmente conhecidos. (46)

Sabe-se que mecanismos de contacto célula a célula e libertação de fatores solúveis, como citocinas e fatores de crescimento, contribuem para a indução da imunossupressão

mediada pelas MSCs. (47) Além disso, estas células possuem também a capacidade de *homing* para os tecidos lesados, o que aumenta o seu potencial terapêutico. (42)

Estas características permitem que as MSCs intervenham tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. (48)

Os fatores solúveis com propriedades imunomoduladoras, tanto podem ser produzidos constitutivamente como libertados após interação com as células alvo. (45) Exemplos deste grupo são o óxido nítrico (NO) e a indoleamida 2,3-dioxigenase (IDO), que são libertados pelas MSCs depois da estimulação com IFN- γ , produzido pelas células alvo. A expressão de IDO promove a depleção de triptofano no meio, resultando assim, na inibição da proliferação linfocitária e além disso permitem também a inibição da proliferação de células produtoras de IFN- γ , as Th1. Estes fatores juntamente com a prostaglandina E2 (PGE2) bloqueiam a atividade de células NK. (43, 45, 49)

Outros fatores solúveis, tais como TGF- β 1, fator de crescimento do hepatócito (HGF), IL-10, Heme-oxigenase 1 (HO-1), IL-6 e HLA-G5 solúvel, são constitutivamente produzidos pelas MSC. (figura 6) A IL-6 tem influência da redução do burst respiratório e impede a apoptose de neutrófilos pela indução da fosforilação do transdutor de sinal do fator de transcrição, por sua vez a produção do HLA-G5 solúvel tem a capacidade de suprimir a proliferação de células T, assim como das células NK e células Tc e promove a diferenciação de células Treg. (43, 50) A produção destas moléculas pode ser aumentada devido a libertação de certas citocinas pelas células alvo, através da sua interação com as MSCs. (45, 47)

No entanto, a inibição de qualquer uma destas moléculas não resulta numa perda completa da atividade imunossupressora, o que significa que nenhuma destas moléculas tem um papel exclusivo e que a modulação das MSC é um sistema redundante mediado por vários fatores solúveis. (45)

Prevê-se que a ação geral das MSC seja de orientar a resposta imune em direção a fenótipos anti-inflamatórios, incluindo a mudança da resposta Th1 no sentido Th2, causando por exemplo, uma diminuição da produção de IFN- γ e um aumento de IL-4. (48, 51)

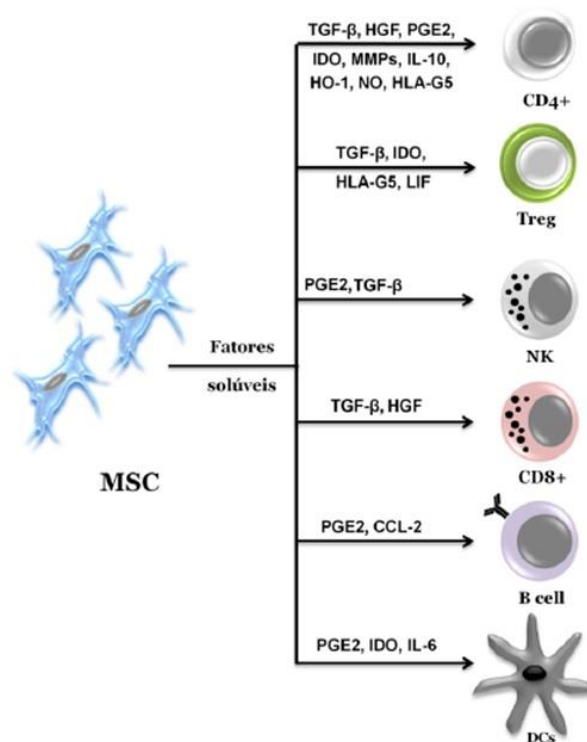


Figura 6 Propriedades imunomoduladoras das MSC. Diversos fatores solúveis secretados pelas MSC estão associados às suas características moduladoras sobre linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, células Treg, células NK, células B e células dendríticas. Adaptado de (50)

5.1. Imunomodulação em linfócitos T e Artrite Reumatóide

Depois da formação do TCR, as células T proliferam e exercem várias funções efetoras, incluindo a libertação de citocinas, e no caso dos linfócitos Tc, a citotoxicidade. Mas esta proliferação pode ser inibida pelas MSC, evitando a entrada das células na fase S do ciclo celular, mediante o bloqueio irreversível da fase G0/G1. (43, 45)

A formação de células Th1, vai permitir que exista produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , mas segundo a literatura, após a co-cultura com MSC, estas inibem a proliferação celular conduzindo a uma diminuição das citocinas inflamatórias e a um aumento da produção de IL-4 por parte das Th2, o que indica uma mudança das células T de um estado pró-inflamatório para um estado anti-inflamatório. (18, 45)

As MSC apresentam também um papel imunomodulador sobre as células Th17, diminuindo a produção de citocinas da família da IL-17 e IL-22. Este efeito é conseguido através da produção de PGE2. (18)

Em relação aos linfócitos Treg, as MSC foram reportadas como indutoras da produção de IL-10 pelas DCs, que por sua vez origina um aumento da produção destas células, com consequente produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e TGF- β . (18, 45) Além disso, após co-cultura com MSC, estas parecem induzir diretamente a proliferação de células Treg através da liberação do imunomodulador HLA-G5. (52)

De uma forma geral, como se pode observar de uma forma esquemática na figura 7, as MSC regulam a resposta imune reduzindo a síntese e diferenciação de DCs, aumentando o número de células Treg e suprimindo as células Th e Tc efetoras, através de vários fatores de crescimento, óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), HO-1, PGE2 e IDO. (48)

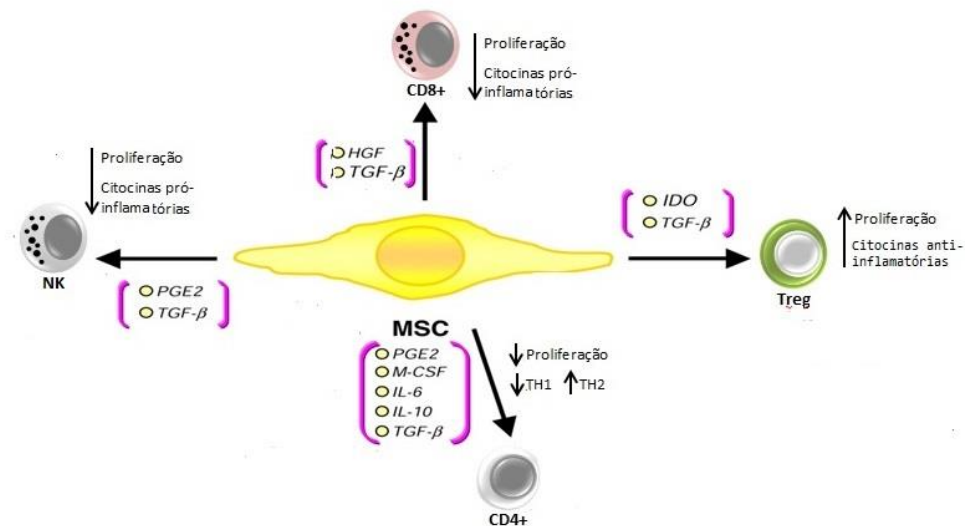


Figura 7 Fatores solúveis libertados pelas MSC e os seus efeitos nos diversos tipos de célula T Adaptado de (41)

O estadio inicial da AR pode ser dividido em duas fases principais: a indução de autoimunidade e consequente evolução para um processo inflamatório destrutivo.

A progressão da resposta autoimune implica o envolvimento de células Th1 e Th17 autorreativas para os tecidos das articulações e a consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias. Consequentemente as MSCs são um forte candidato para a reparação articular da doença devido as suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras.(53)

Em estudos realizados em artrite induzida por colagénio (CIA), verificou-se que uma única injeção de MSCs permitiu uma diminuição do dano do osso e cartilagem através

da inibição da proliferação de linfócitos T e da modulação da expressão de citocinas inflamatórias, diminuindo particularmente o TNF- α . (54)

As MSC possibilitam também uma diminuição da expansão celular Th1/Th17 e induzem a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 nos nódulos linfáticos e nas articulações. (54)

»» **Objetivos**

Neste estudo, o principal objetivo foi verificar qual a ação imunomoduladora das células mesenquimais do estroma em diferentes subpopulações de células T, células Th e Tc nos seus diferentes compartimentos, naïve, memória central, memória efetora e efetoras, e células Treg do sangue periférico de doentes com Artrite Reumatóide e comparar com os resultados obtidos nas mesmas células de indivíduos saudáveis.

Para atingir este objetivo procedeu-se:

- Quantificação da frequência de células Th e Tc, nos diferentes compartimentos funcionais, produtoras de IL-2, INF- γ e TNF- α , e quantificação da frequência de células Th e Tc produtoras de IL-17, IL-6 e IL-9, bem como, a expressão dessas citocinas ao nível das células, por citometria de fluxo;
- Estudo da expressão génica das citocinas IL-4, IL-10, TGF- β e CTLA4 depois da separação de células Th e Tc por cell sorting;
- Estudo da expressão génica das citocinas IL-10, TGF- β , CTLA4 e Foxp3 depois da separação de células Treg por cell sorting;

» Materiais e Métodos

1. Amostras

Para este estudo foram colhidas doze amostras de sangue periférico de doentes com artrite reumatóide acompanhados no Serviço de Reumatologia do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, diagnosticados segundo os critérios de classificação da doença da Sociedade Americana de Reumatologia/Liga Europeia Contra o Reumatismo. Doentes em terapia biológica (anti-TNF, Tocilizumab, Rituximab), com história prévia de cancro, infeção aguda ou crónica e outras doenças inflamatórias/auto-imunes foram excluídos. Foram agrupados por doença ativa (n=5) e inativa (n=7), sendo 66,7% do sexo feminino e apresentando uma idade média de $52,8 \pm 9,4$ anos. **Tabela III**

Como amostras controlo foram recrutados oito dadores saudáveis, sem historial de doenças autoimunes e/ou inflamatórias, com uma média de idades de 41 ± 10 anos, com 90% do sexo feminino.

Para ambas as populações, as amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos de Heparina-lítio.

Todos os dadores deram o seu consentimento informado para a participação no projeto e o estudo foi aprovado pelo comité de ética local.

2. Isolamento de células mononucleares por gradiente de densidade

As amostras de sangue heparinizado foram diluídas em soro fisiológico (1:2) e posteriormente colocados lentamente 5ml (de forma a evitar a mistura dos dois líquidos) sobre 2,5ml de Lymphoprep (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá) em tubos de vidro de fundo redondo. Seguiu-se uma centrifugação de 20 minutos a 1200 g, a 18°C. O anel das células mononucleares situado entre o lymphoprep e o plasma, foi recolhido com uma pipeta de Pasteur, para um tubo de Falcon (Beckon Dickinson Bioscience (BD), San Jose, USA) de 50ml. De seguida realizou-se uma lavagem da suspensão celular com Hank's Balanced Salt Solution 1x (HBSS), centrifugando-se esta mistura durante 15 minutos a 430 g, a 18°C. O sobrenadante foi descartado, e efetuou-se nova lavagem com HBSS 1x. Depois de decantado o sobrenadante, adicionou-se ao *pellet* 1ml de RPMI 1640 (Gibco) e fez-se a contagem do número de células mononucleares e avaliação da viabilidade celular pelo método de azul trypan em câmara de Neubauer.

3. Co-cultura de MSC derivadas de medula óssea de doadores saudáveis com MNC do sangue periférico

As culturas foram executadas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Suíça) com as MNCs isoladas e as MSCs humanas alogênicas derivadas de medula óssea de doadores saudáveis, em presença ou não de 50ng/ml de PMA (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 1µg/ml de ionomicina (Boehringer Mannheim, Germany) e de 10µg/ml brefeldina A (Golgi plug- Sigma, Saint Louis, MO, USA).

Para esta estratégia, diferentes condições foram realizadas: MNC; MNC+MSC; MNC+PMA+Ionomicina; MNC+PMA+Ionomicina+MSC. Foi adicionado a cada poço um total de 500 000 MNC e 250 000 MSC, (*ratio* 1:2). As culturas foram mantidas num meio de RPMI 1640 (Gibco) e em 10% de soro de bovino fetal, num volume final de 1ml. As placas foram mantidas em cultura durante 24 horas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂ e 90% humidificada. Após a incubação as culturas foram ativadas durante 4 horas e mantidas no mesmo ambiente.

4. Caracterização funcional das subpopulações de células T e avaliação da produção de citocinas

Para o estudo funcional dos subtipos de células T através da produção de citocinas pró-inflamatórias, a 250µl de amostra foram adicionados os seguintes anticorpos monoclonais: CD3 Azul Pacífico (clone UCHT1. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA), CD8 Aloficocianina Helite 7 (clone SK1. BD, San José, CA, EUA), CD4 Ficoeritrina cianina 7 (clone SFC112T4D11. Beckman Coulter, Brea, EUA), CD27 Ficoeritrina cianina 5 (clone 14CD27. BC, Brea, EUA), CD45Ra Aloficocianina (clone HI100. BD, San José, EUA). Após a adição dos anticorpos monoclonais os tubos foram incubados no escuro durante 10 minutos, adicionou-se depois 100µl do reagente fixante do Kit IntraprepTM (Beckman Coulter, Brea, EUA) e seguiu-se uma incubação de 10 minutos, as células foram de seguida lavadas com 2mL de PBS 1x (Gibco) e centrifugadas 5 minutos a 430 g. Adicionou-se 100µl do reagente permeabilizante do kit IntraprepTM, incubou-se no escuro durante 10 minutos e adicionaram-se os anticorpos monoclonais intracitoplasmático: TNF-α Isotiocianato de Fluoresceína (clone MP6-XT22. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA)

e IL-17 Ficoeritrina (clone SCPL1362. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA) (tubo 1); IFN- γ Isotiocianato de Fluoresceína (clone 4S.B3. . BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA) e IL-6 Ficoeritrina (clone MQ2-6A3. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA) (tubo 2); e IL-2 Isotiocianato de Fluoresceína (clone MQ1-17H12. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA) e IL-9 Ficoeritrina (clone MH9A3. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA) (tubo 3) e foram a incubar 10 minutos. Seguiu-se uma lavagem com 2mL de PBS 1x (Gibco) e uma centrifugação de 5 minutos a 430 g. Por fim, as amostras foram ressuspensas em 250 μ l de PBS 1x (Gibco) e adquiridas no citometro de fluxo.

5. Aquisição e análise por citometria de fluxo

As células foram adquiridas num citometro de fluxo FACS CantoTM II (BD), usando o *software* FACSDiva 6.1.2 (BD).

Os dados foram depois analisados pelo *software* Infinicyt 1.5 (**Figura 8**) (Cytognos, Salamanca, Espanha).

6. Separação e purificação das populações celulares Th, Tc e Treg

Para a separação e purificação dos subtipos de células T, a 250 μ l de amostra foram adicionados os seguintes anticorpos monoclonais: CD4 Azul Pacífico (clone RPA-T4. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA), CD3 Aloficocianina Helite 7 (clone SK7. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA), CD25 Isotiocianato de Fluoresceína (clone M-A251. BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA), CD8 Aloficocianina (clone B9.11. Beckman Coulter, Brea, EUA) e CD127 Ficoeritrina (clone R34.34. Beckman Coulter, Brea, EUA). Após a adição dos anticorpos monoclonais os tubos foram incubados durante 10 minutos e lavados com 2ml de PBS (Gibco).

A separação foi realizada usando um citometro de fluxo FACS AriaTM II (BD). As amostras recolhidas depois de centrifugadas 5 minutos a 0,4g foram mantidas em 350 μ l de tampão de lise RLT (Qiagen, Hilden, Germany).

7. Análise da expressão génica

A extração de RNA total foi feita usando o RNeasy Micro Kit (Quiagen) de acordo com as instruções do fornecedor. Para a transcrição reversa do RNA extraído foi usado o Tetra cDNA Synthesis ® (Bioline, London, UK), de acordo com as instruções do fabricante. De seguida foi feita a quantificação relativa da expressão génica por PCR em tempo real pelo LightCycler 480 II (Roche Diagnostic, Rotkreuz, Suíça). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando 1X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 1X QuantiTect Primer Assay (IL-10: QT00041685; IL-4: QT00012565; TGF- β : QT00000728; CTLA4: QT01670550; Foxp3: QT00048286) e 2 μ l de amostra de cDNA num volume total de 10 μ l. O perfil térmico foi o seguinte: 15min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 55°C e 30 seg a 72°C. Os resultados do PCR em tempo real foram analisados com o *software* LightCycler (Roche Diagnostics). Foram utilizados os genes de referência B2M e YWHAZ, obtidos através do *software* geNorm (PrimerDesign Ltd.). Por fim a normalização dos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada pelo método delta-Ct.

8. Análise Estatística

Para a análise estatística foi usado o Statistical Package for Social Sciences (IBMSPSS, version 17.0, Armonk, NY, USA), realizando-se os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para amostras independentes e o Wilcoxon de amostras emparelhadas. Os resultados foram expressos como percentagem da média \pm desvio padrão e as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o *p-value* < 0,05.

Tabela III Características socio-democráticas e clínicas dos doentes em estudo

	AR Inativa	AR Ativa
Feminino (%)	57,1	80
Idade (média \pm SD)	49,1 \pm 7,7	56,2 \pm 10,9
FR (%)	100	100
Anti-CCP (%)	100	100
DAS	1,9 \pm 0,8	4,6 \pm 0,7

Metotrexato % Dose média (mg/sem.)	85,7 14,3±2,3	80 17±10,4
Prednisona % Dose média (mg/dia)	71,4 2,7±2,3	100 5,5±1,1
Hidroxicloroquina % Dose média (mg/dia)	28,6 114±195,2	60 240±219,1
Salazopirina % Dose média (mg/dia)	42,8 857±1069	60 1600±6,2

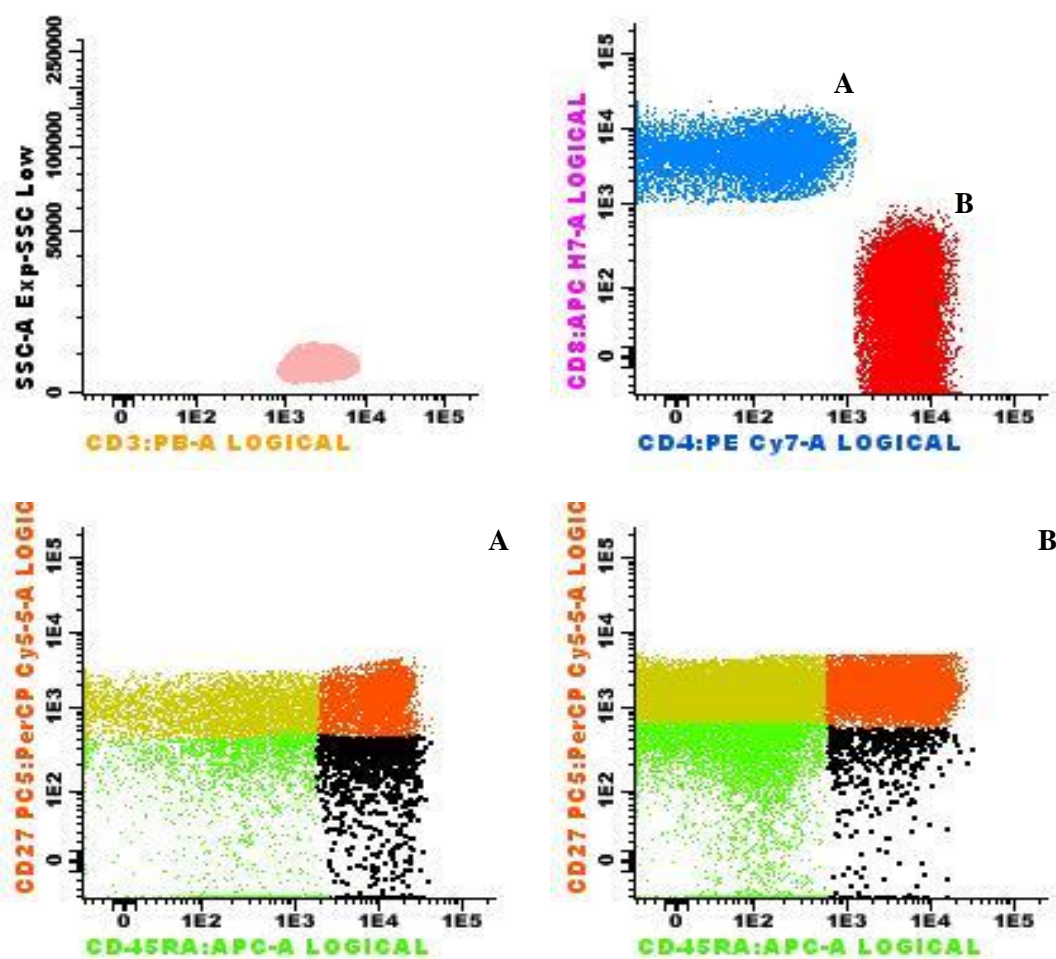


Figura 8 Representação gráfica da estratégia utilizada para a identificação das diferentes populações de células T e dos seus compartimentos funcionais, mediante a utilização dos anticorpos monoclonais CD3, CD4, CD8, CD27 e CD45RA. Linfócitos T (rosa), Linfócitos T CD4⁺ (vermelho), Linfócitos T CD8⁺ (azul), Células Naive (laranja), Células MC (amarelo), Células ME (verde), Células efectoras (preto).

» Resultados

Para compreender melhor os efeitos reguladores das MSCs sobre as subpopulações de linfócitos T, foram realizadas culturas celulares com MNC estimuladas com PMA e ionomicina e outras idênticas mas com a adição de MSC.

Abaixo são apresentados esses mesmos resultados, onde se pode observar a frequência de células T produtoras de diversas citocinas, como IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-6 e IL-9 com a respectiva percentagem de inibição e a expressão relativa de cada uma, dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF), nos diferentes grupos em estudo: controlo, doentes com artrite reumatóide (AR), doentes com artrite reumatóide inativa (DAS<5) (AR Inativa) e doentes com artrite reumatóide ativa (DAS>5) (AR ativa).

1. Quantificação da frequência de células T CD4⁺ ou CD8⁺ produtoras de citocinas e respetiva expressão (MIF), na ausência e presença de MSC, após estímulo com PMA e ionomicina

A. Interleucina 2

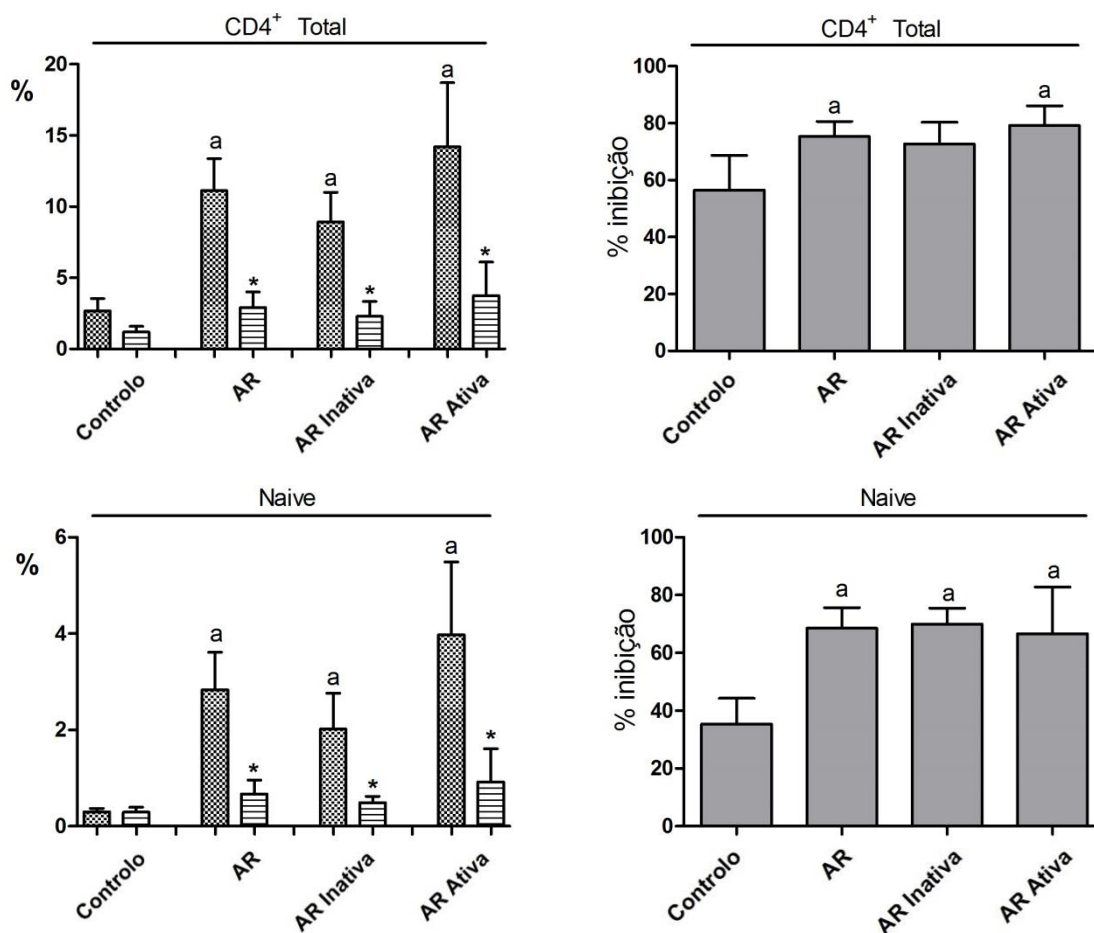
Na **Figura 9**, observou-se que após co-cultura com MSC existiu uma diminuição da frequência de células T CD4⁺ totais produtoras de IL-2, nos doentes com a doença inativa e ativa, o que não se verificou nos controlos. Os linfócitos Th dos doentes apresentam uma maior percentagem de inibição, como tal, parecem ser mais sensíveis ao efeito inibidor das MSCs. Verificou-se também que a frequência de células a produzir IL-2 é superior em doentes com AR, comparativamente aos controlos saudáveis, em especial nos doentes com doença ativa.

Fazendo a análise dividida pelos diferentes compartimentos funcionais, observou-se que estes seguem a mesma linha, com uma maior frequência de produção de IL-2 nos doentes, em particular nos ativos, com significado estatístico quando comparados com o grupo controlo. Observou-se também que em todos os compartimentos, após a co-cultura com MSC, ocorreu uma diminuição da produção da frequência de células a produzir esta citocina, com significado estatístico nos doentes inativos e ativos.

O grupo dos doentes continuou a ser o mais sensível aos efeitos imunomoduladores das MSC, apresentando significado estatístico em todos os compartimentos exceto no das células efectoras.

Em relação à quantidade relativa de IL-2, apresentada na **Figura 12 I**, observou-se que as células T CD4+, após a exposição às MSCs, diminuem a produção da citocina, com significado estatístico, exceto no grupo controlo.

As células naïve, são as mais resistentes aos efeitos imunomodulatórios, não se registando diferenças estatísticas, inclusive, havendo até um aumento de produção de IL-2 quando adicionado MSCs, no grupo controlo. Verificou-se também um aumento da produção da citocina nos doentes, com significado estatístico, em relação ao grupo controlo, novamente com exceção das células naïve.



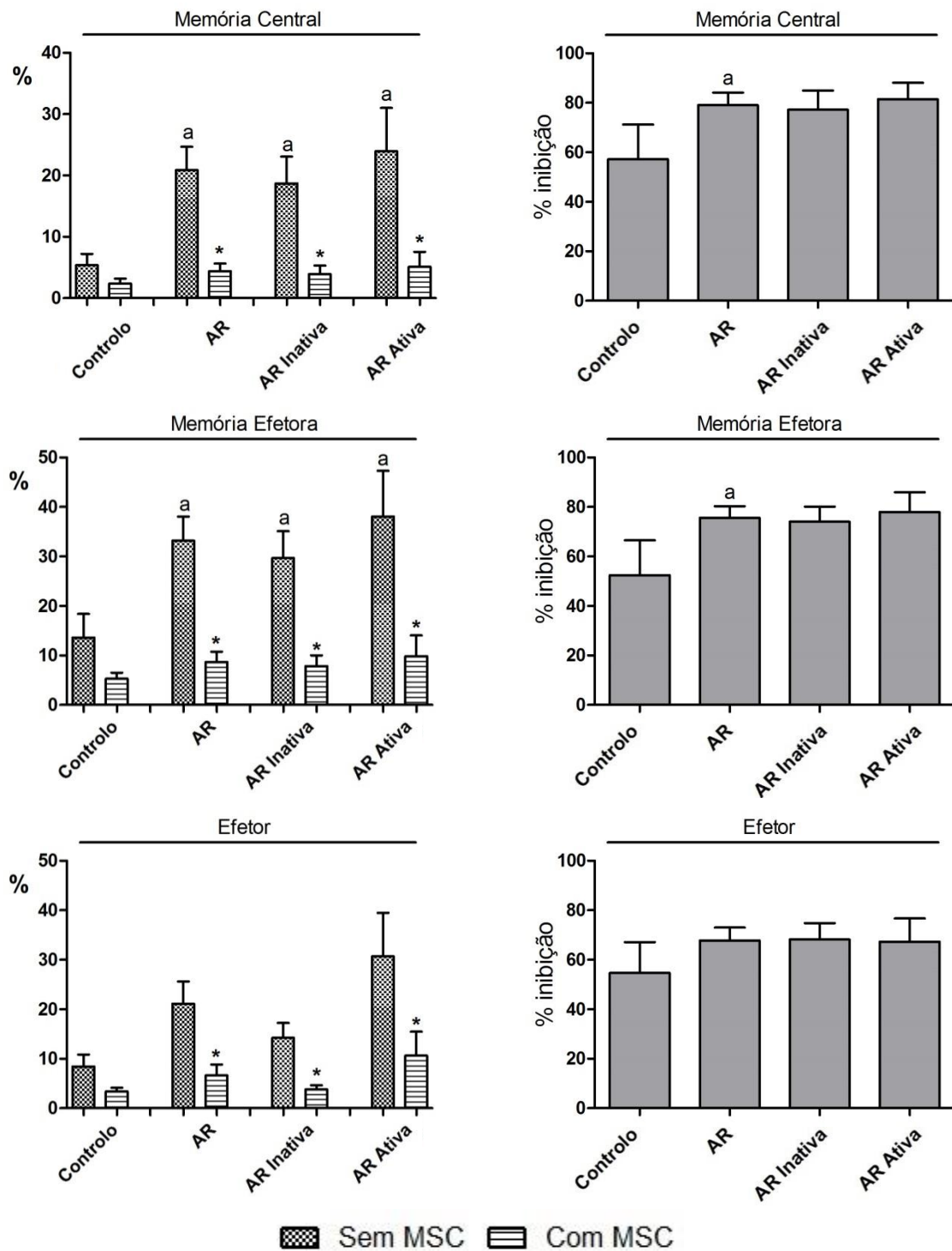


Figura 9 Representação gráfica da frequência de células T CD4⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de IL-2, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição. *) Sem MSC versus Com MSC, $p < 0,05$, Wilcoxon; a) Controlo versus AR/AR inativa/AR ativa, $p < 0,05$; b) Inativo versus Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 7; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

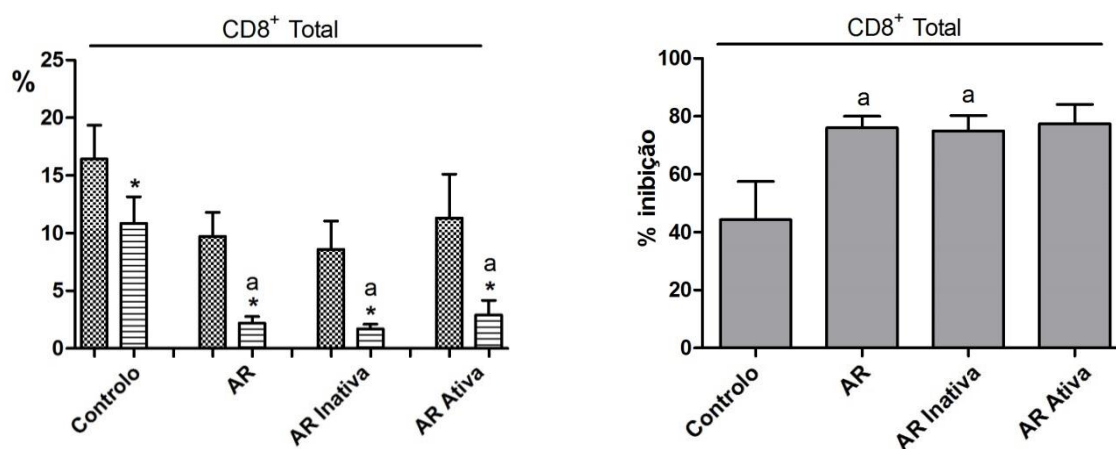
Na **Figura 10**, pode observar-se os resultados respeitantes às células T CD8⁺. Relativamente às células totais produtoras de IL-2, existiu uma diminuição significativa da percentagem de células que produzem esta citocina em todos os grupos, com uma diminuição mais acentuada nos doentes. O grupo mais sensível ao efeito das MSCs continuou a ser o grupo dos doentes com AR, registando uma inibição de cerca de 80% da frequência de células T CD8⁺ produtoras de IL-2, tanto na doença ativa como inativa.

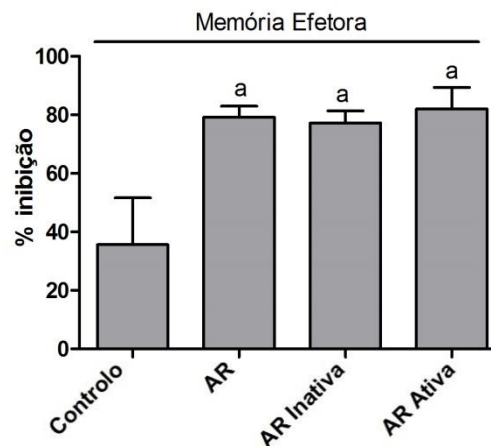
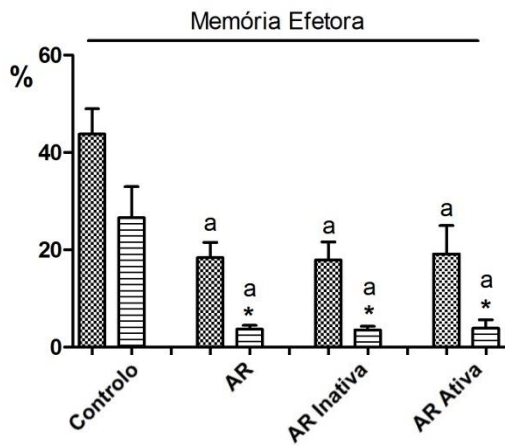
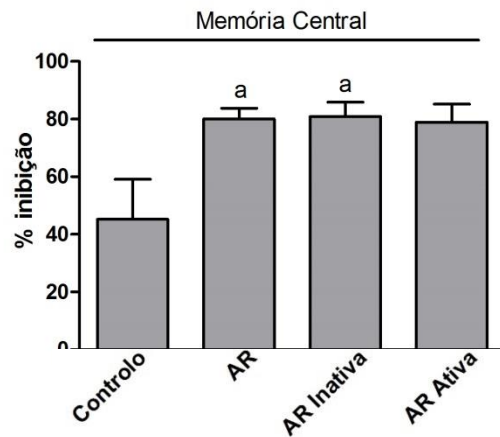
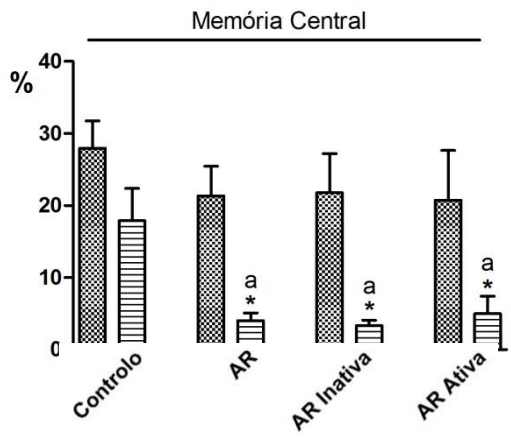
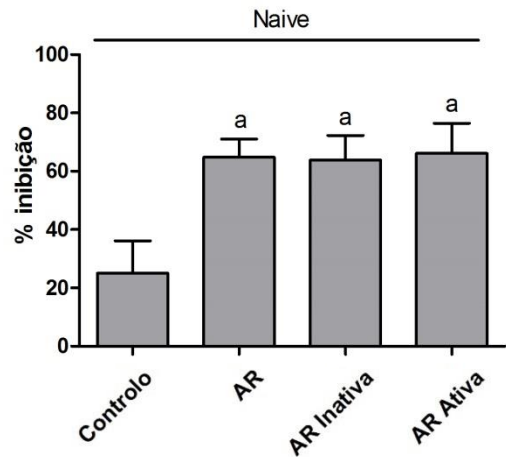
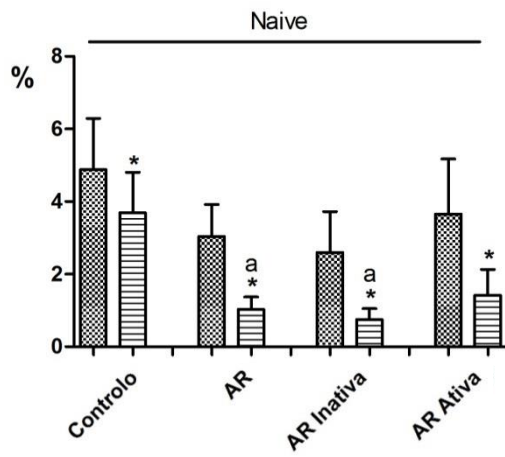
As MSCs exerceram também os seus efeitos imunomoduladores em todos os compartimentos, apesar de no grupo controlo não se registar uma diminuição significativa nos compartimentos de memória e efetor. Este grupo seguiu também o mesmo registo e foi o mais resistente aos efeitos inibitórios das MSCs.

Ao contrário das células T CD4⁺, neste caso, observou-se uma diminuição da frequência de células produtoras de IL-2 nos doentes comparativamente ao grupo controlo, estatisticamente significativa apenas no compartimento de memória efetora e efetor.

Relativamente à média de intensidade de fluorescência de IL-2 por parte das células T CD8⁺ (**Figura 12 II.**), verificou-se que estas células apresentaram o mesmo comportamento que as células T CD4⁺. Existiu uma diminuição da produção de IL-2 após a co-cultura com MSC, em todos os grupos, com diferenças estatísticas, exceto no grupo controlo.

Apesar da frequência de células produtoras de IL-2 diminuir no grupo da AR, a quantidade de citocina produzida por cada célula é mais elevada neste mesmo grupo, registando-se diferenças estatísticas exceto no compartimento de células naïve. Este compartimento funcional parece ser o mais resistente aos efeitos imunomodulatórios.





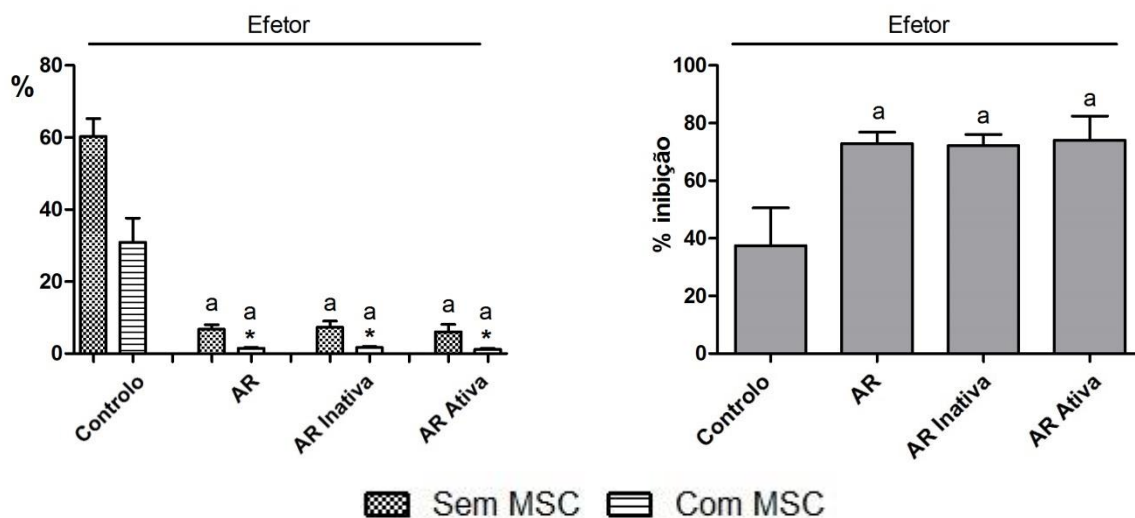


Figura 10 Representação gráfica da frequência de células T CD8⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de IL-2, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controle e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respectivas percentagens de inibição. *) Sem MSC versus Com MSC, p<0,05, Wilcoxon; a) Controle versus AR/AR inativa/AR ativa, p<0,05; b) Inativo versus Ativo, p<0,05. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controle) = 7; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

Analisando a Figura 11, observou-se que existe uma maior variação de resultados no grupo controle. Após co-cultura com MSCs existiu até um potenciamento da produção de IL-2, em alguns casos, o que não se observou no grupo de AR.

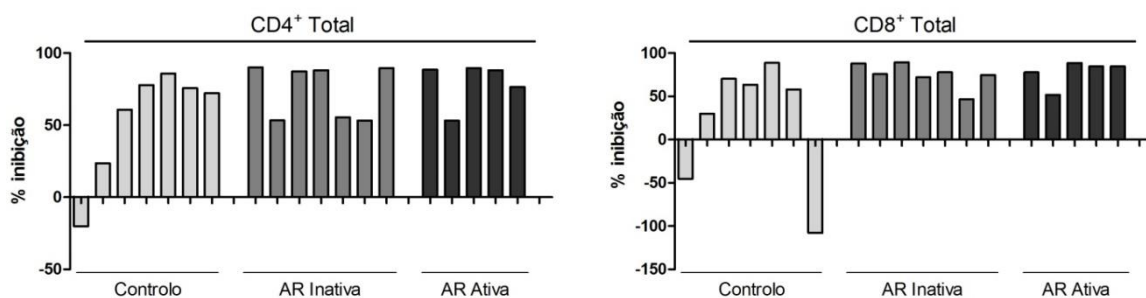
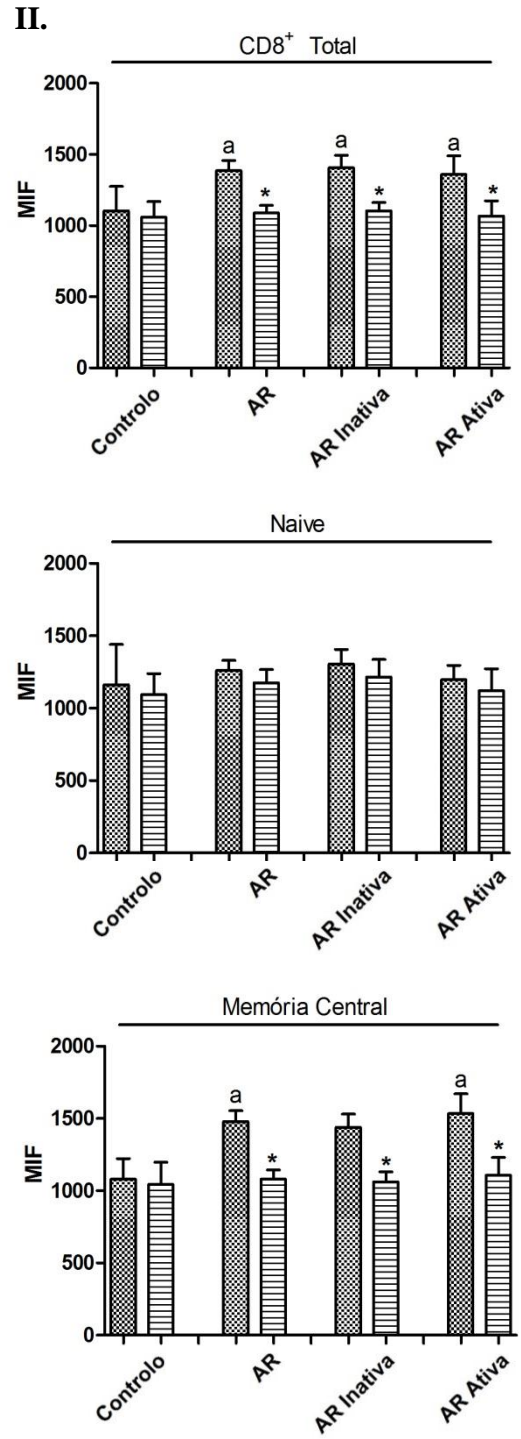
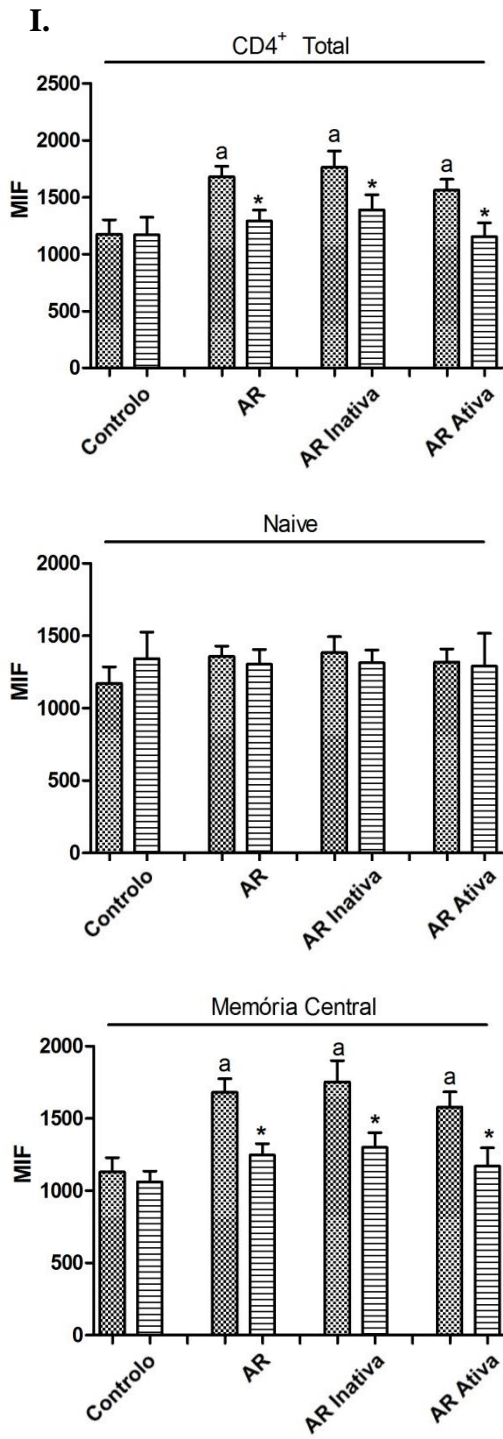


Figura 11 Representação gráfica da percentagem de inibição de IL-2 das células T CD4⁺ e células T CD8⁺, indivíduo a indivíduo



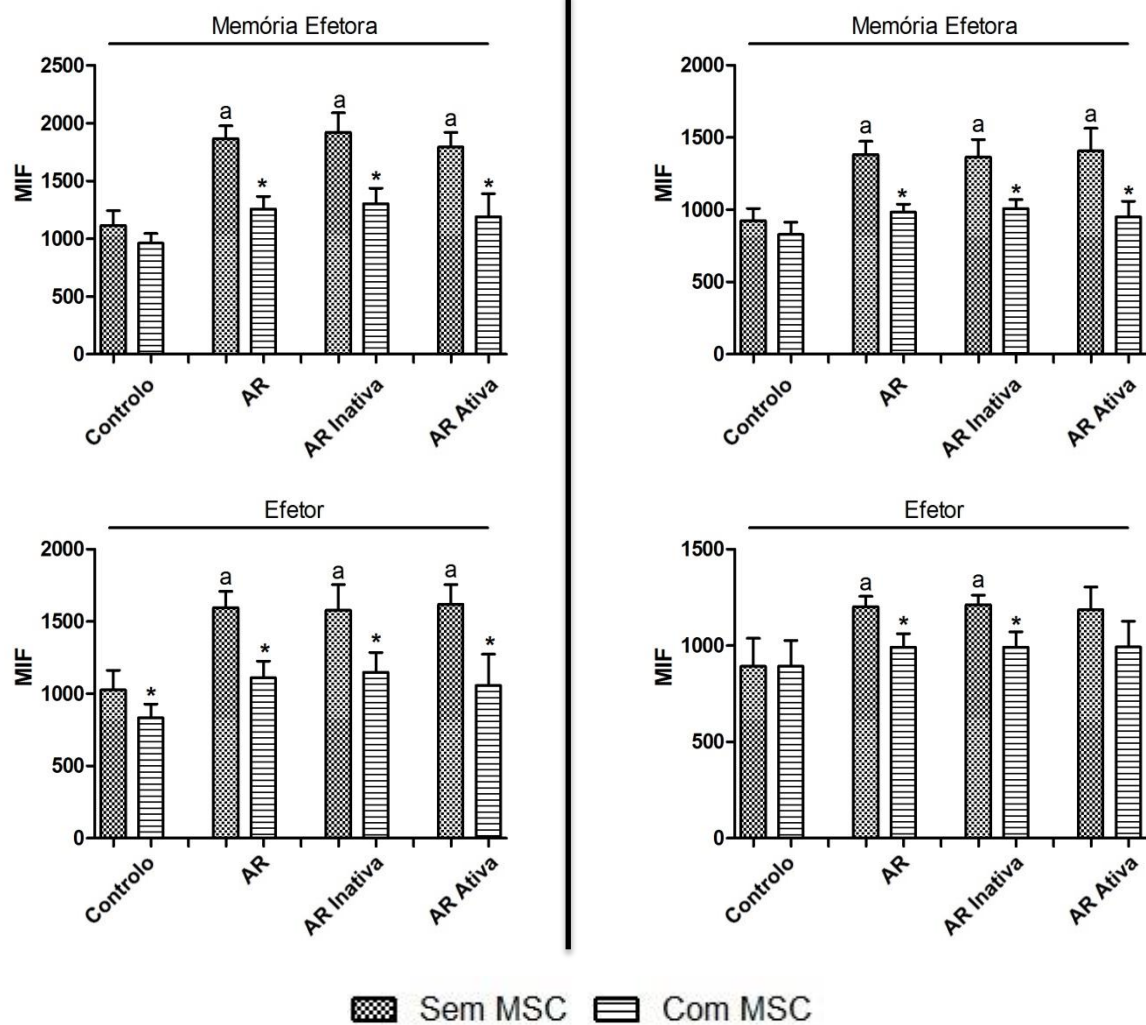


Figura 12 Representação gráfica da MIF de IL-2 pelas I. células T CD4⁺ e II. Células T CD8⁺ assim como dos seus compartimentos, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC *) Sem MSC versus Com MSC, $p < 0,05$, Wilcoxon; a) Controlo versus AR/AR Inativa/AR Ativa, $p < 0,05$; b) Inativo versus Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 7; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

B. Interferão- γ

Examinando os resultados das células T CD4⁺ totais da Figura 13, verificou-se que existiu uma diminuição da frequência de células a produzir IFN- γ depois do contacto com MSCs, sem significado estatístico no grupo controlo. Sendo que existiu uma maior frequência de células a produzir a citocina nos doentes com AR apesar de não existir uma diferença significativa relativamente ao grupo controlo.

A percentagem de inibição é de aproximadamente 40%, não existindo diferenças entre os grupos.

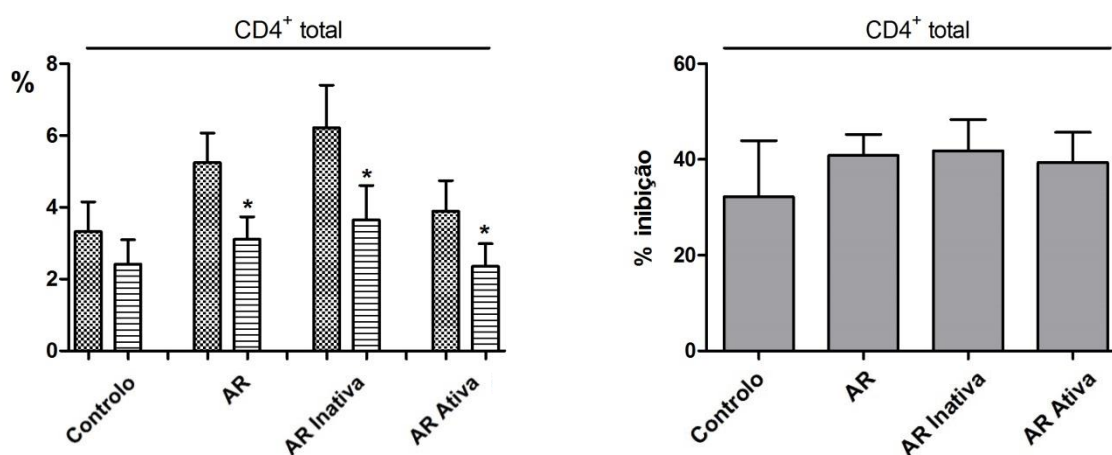
Pela análise dos compartimentos funcionais existiu um aumento significativo da produção de IFN- γ nos doentes com AR inativa, enquanto na AR ativa a produção foi semelhante ao controlo. As células efetoras apresentaram diferenças estatísticas na produção da citocina entre o grupo inativo e ativo, com menor produção nos doentes com a AR ativa.

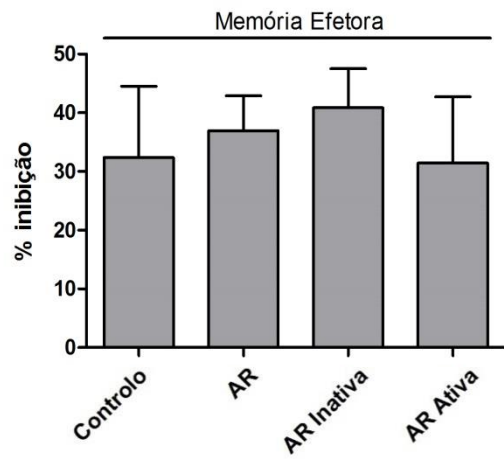
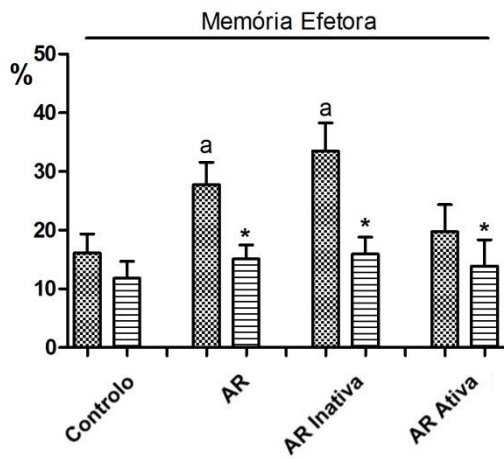
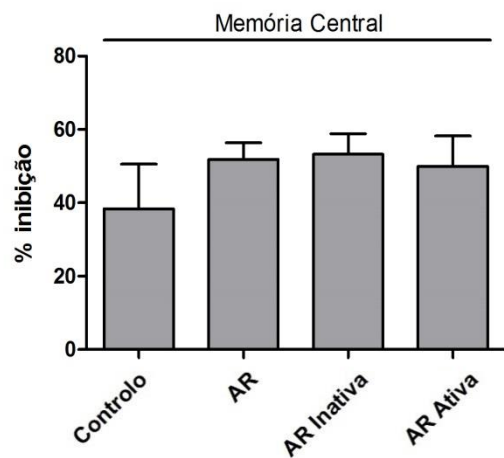
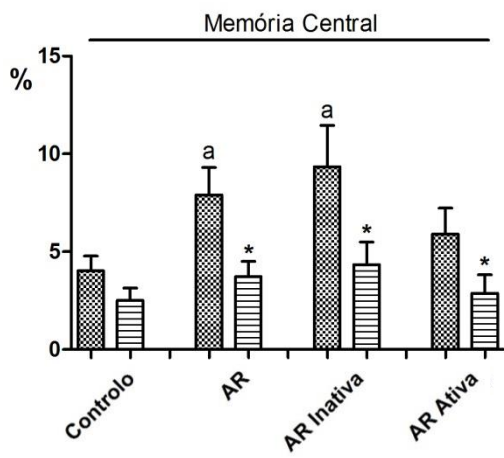
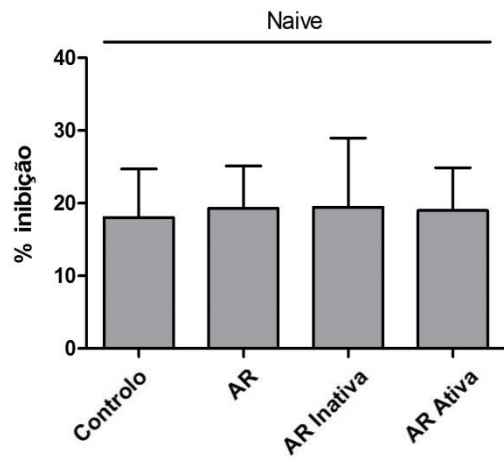
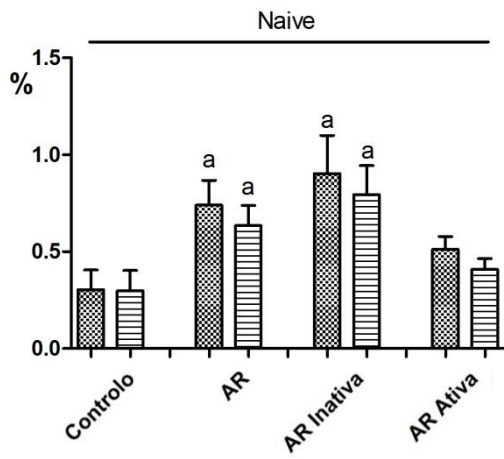
A inibição da produção de IFN- γ foi também semelhante em todos os grupos, não apresentando assim significado estatístico.

Relativamente à expressão de IFN- γ por célula (**Figura 16 I.**), verificou-se uma supressão da mesma, com significado estatístico na maioria das células e grupos, quando em co-cultura com MSCs. Observou-se uma maior produção da citocina no grupo da AR, apesar de não existirem diferenças estatísticas relativamente ao grupo controlo.

Dentro do grupo da AR, os doentes com a doença ativa parecem ser o que têm menor produção de IFN- γ , ao nível intracelular.

Fazendo a análise dos compartimentos de maturação, no geral, as células T efetoras aparentam apresentar uma maior produção da citocina e as células T naïve correspondem às células com menor expressão desta citocina por célula.





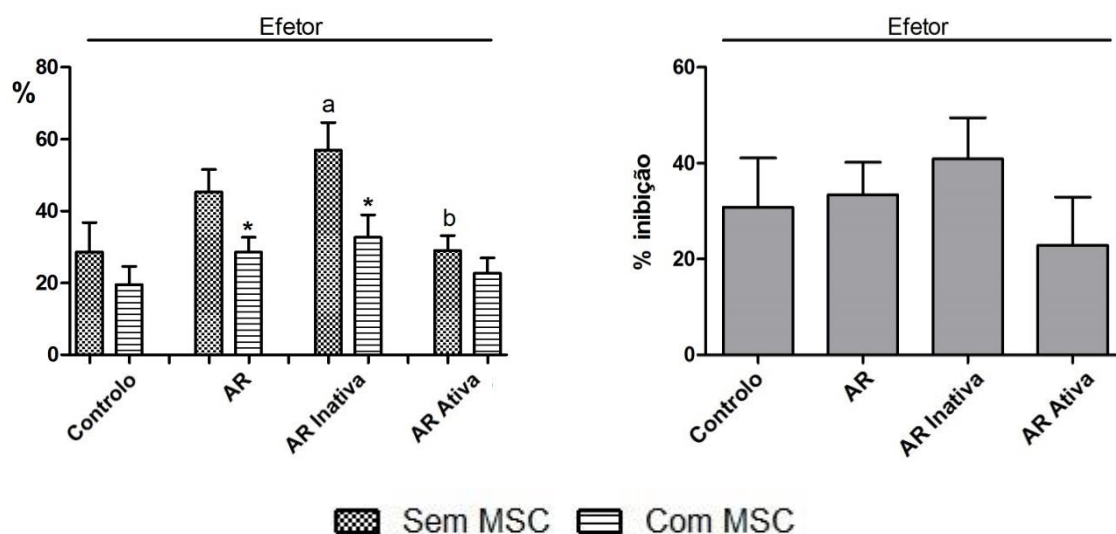


Figura 13 Representação gráfica da frequência de células T CD4⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de IFN- γ , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição. *) Sem MSC *versus* Com MSC, $p < 0,05$, Wilcoxon; a) Controlo *versus* AR/AR Inativa/ AR Ativa, $p < 0,05$; b) Inativo *versus* Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 8; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

Pela análise da **Figura 14**, observou-se que a frequência de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , em co-cultura com MSCs, diminui, sendo, maioritariamente, uma diminuição estatisticamente significativa.

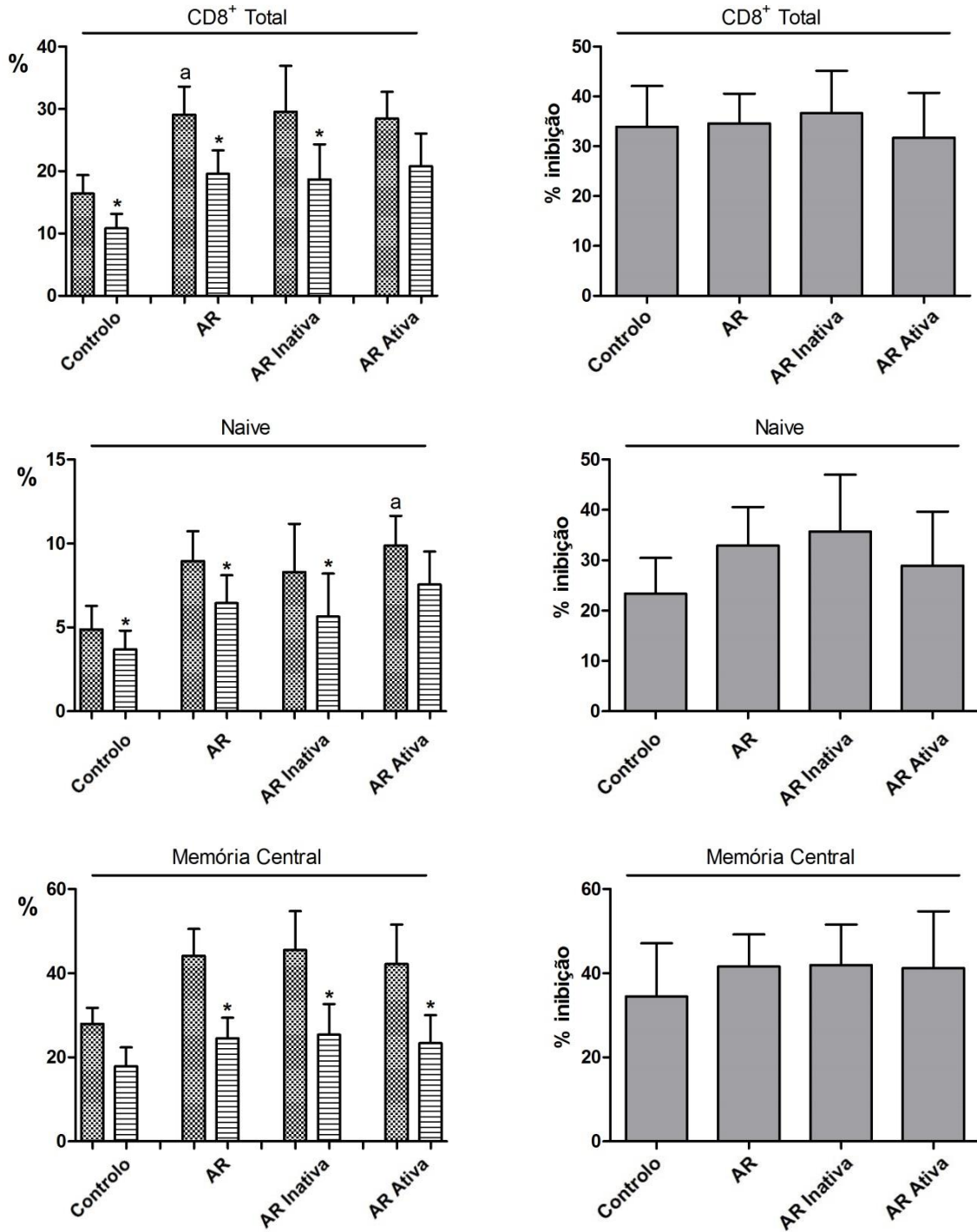
Existiu uma percentagem de células a produzir IFN- γ ligeiramente superior no grupo dos doentes, atingindo significado estatístico apenas nas células totais dos doentes com AR e nas células naïve no grupo dos doentes com DAS > 5.

A percentagem de inibição, tal como nas células T CD4⁺ é semelhante, e não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos, com exceção das células efetoras entre doentes com AR inativa e ativa.

A produção de INF- γ pelas células T CD8⁺ (**Figura 16 II.**) apresentou resultados semelhantes às células T CD4⁺. Após contacto com MSCs existe uma diminuição da produção de IFN- γ , com diferenças estatísticas, exceto no grupo controlo nas células naïve e memória central.

O grupo AR apresentou uma maior produção da citocina comparativamente ao grupo controlo. Em relação à produção por compartimento funcional, as células naïve

parecem ser as que têm uma menor produção de IFN- γ enquanto os restantes compartimentos apresentaram valores muito semelhantes.



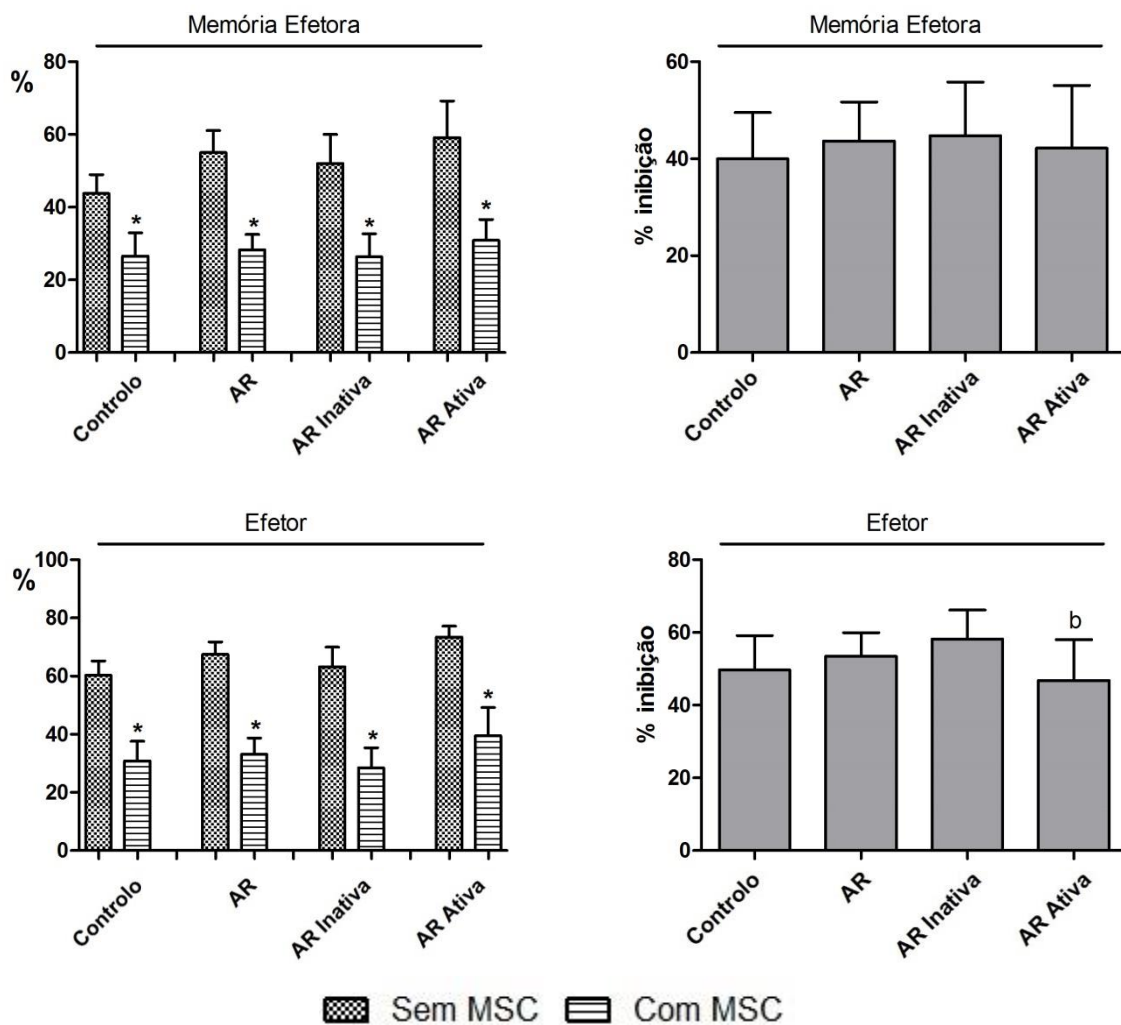


Figura 14 Representação gráfica da frequência de células T CD8⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de IFN- γ , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição. *) Sem MSC versus Com MSC, $p < 0,05$, Wilcoxon; a) Controlo versus AR/AR Inativa/ AR Ativa, $p < 0,05$; b) Inativo versus Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 8; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

Relativamente à **Figura 15**, as células T CD4⁺ apresentam uma grande variação de resultados no grupo controlo, verificando-se o efeito imunomodulador das MSCs em 63% dos indivíduos. Relativamente ao grupo com AR, ocorre uma inibição da produção de IFN- γ em todos os indivíduos.

Por outro lado, nas células T CD8⁺, as MSCs apresentam um efeito potenciador da produção de IFN- γ em pelo menos um indivíduo, em todos os grupos.

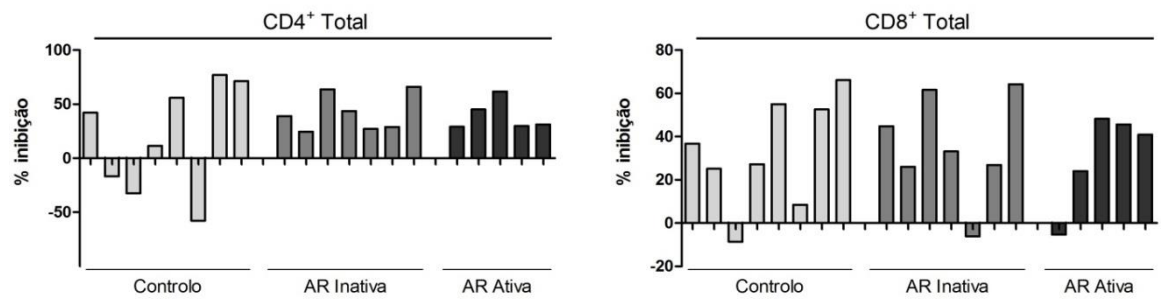
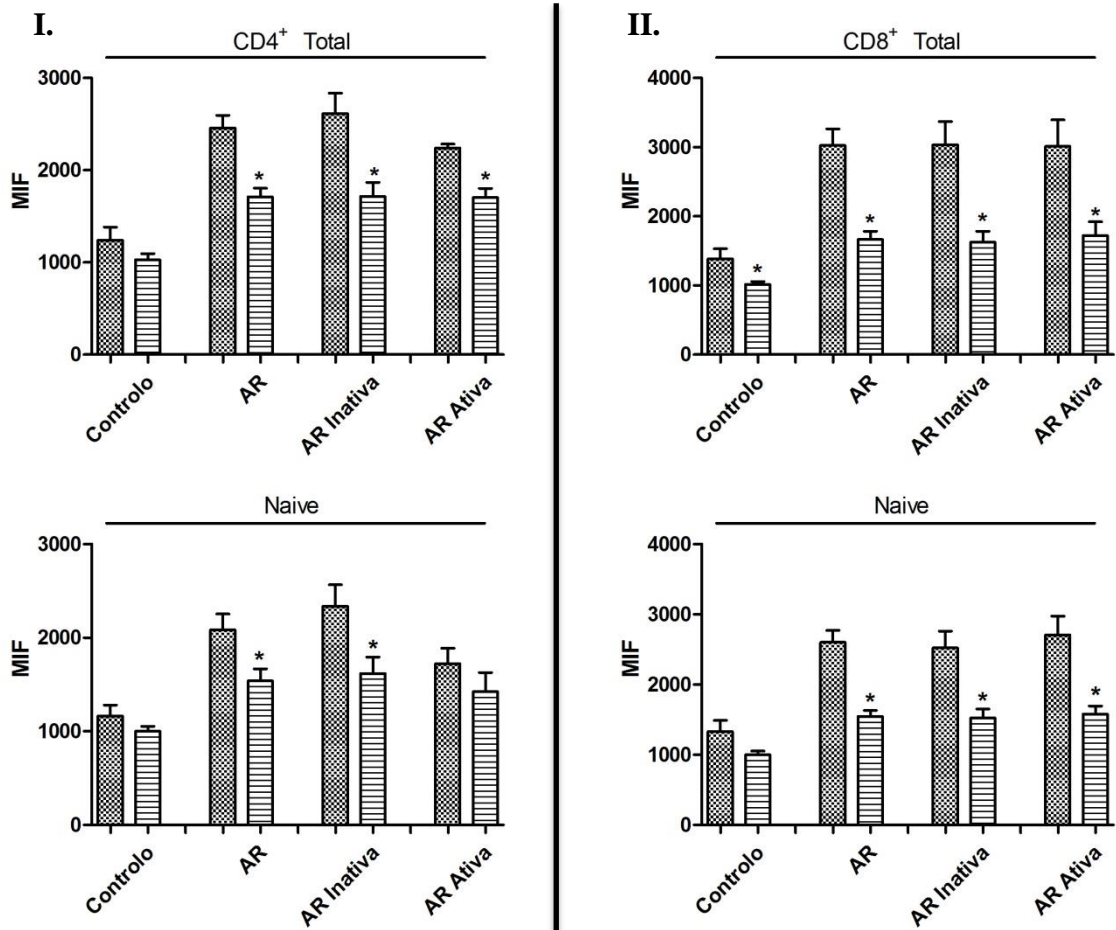
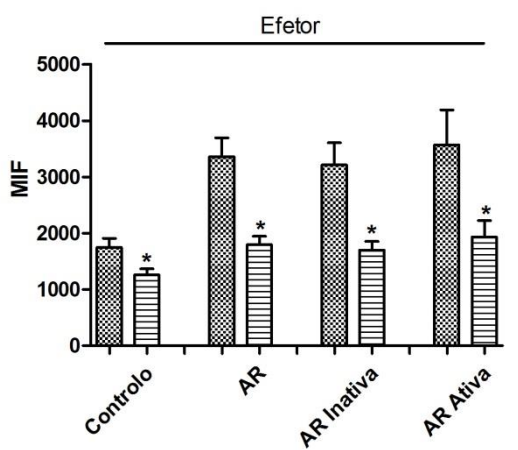
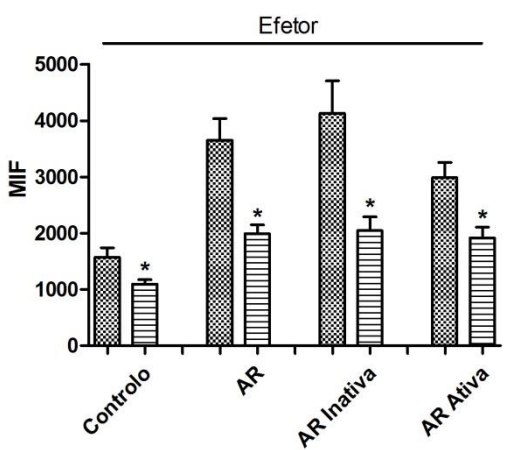
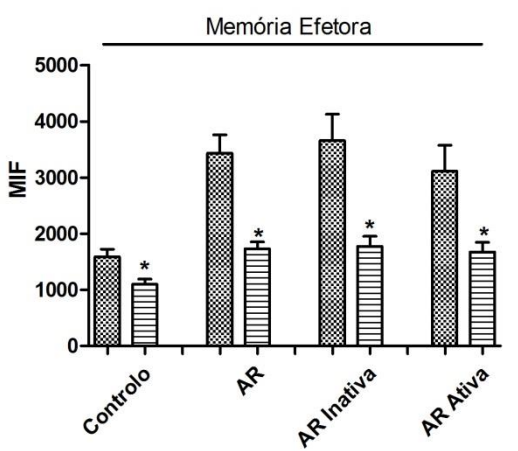
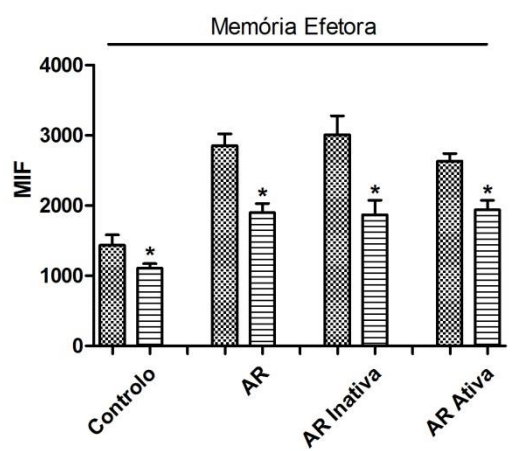
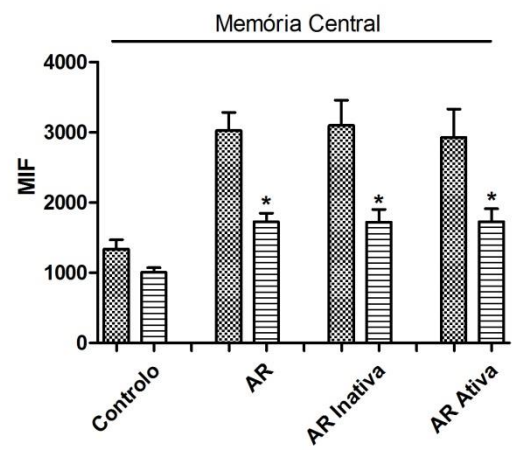
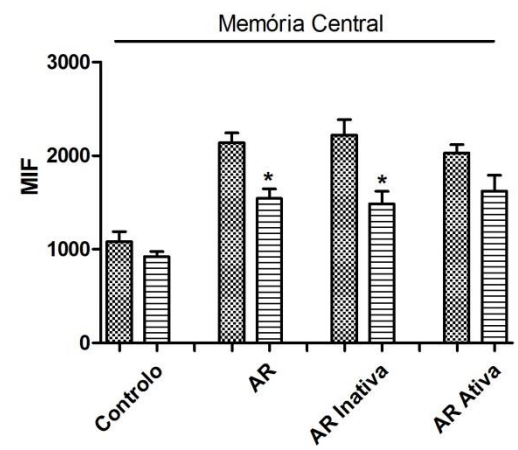


Figura 15 Representação gráfica da percentagem de inibição de IFN- γ das células T CD4⁺ e células T CD8⁺, do grupo controlo e grupo AR, indivíduo a indivíduo.





 Sem MSC
  Com MSC

Figura 16 Representação gráfica da MIF de IFN- γ pelas I. células T CD4⁺ e II. Células T CD8⁺ assim como dos seus compartimentos, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC *) Sem MSC *versus* Com MSC, $p < 0,05$, Wilcoxon; a) Controlo *versus* Doentes/Inativo/Ativo, $p < 0,05$; b) Inativo *versus* Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 8; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

C. Fator de Necrose Tumoral- α

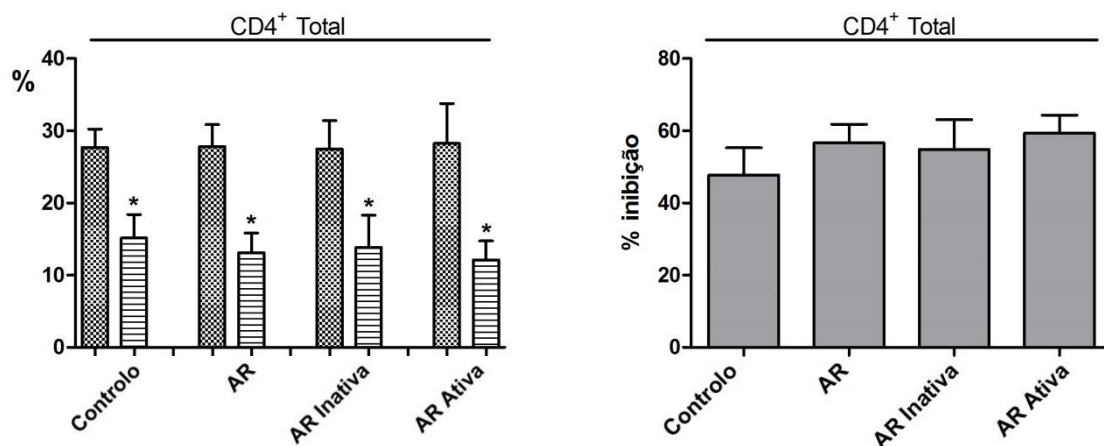
Na **Figura 17**, observou-se que existiu uma diminuição da frequência de células produtoras de TNF- α , quando em contacto com MSCs, com significado estatístico, em todos os compartimentos e grupos estudados. Não se verificaram diferenças na percentagem de inibição entre o grupo controlo e o grupo AR, sendo esta inibição menos acentuada nas células efetoras.

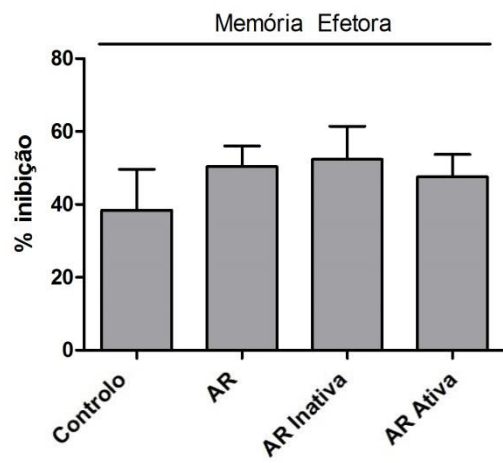
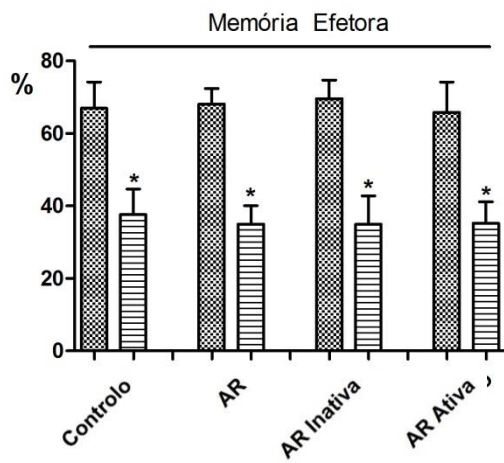
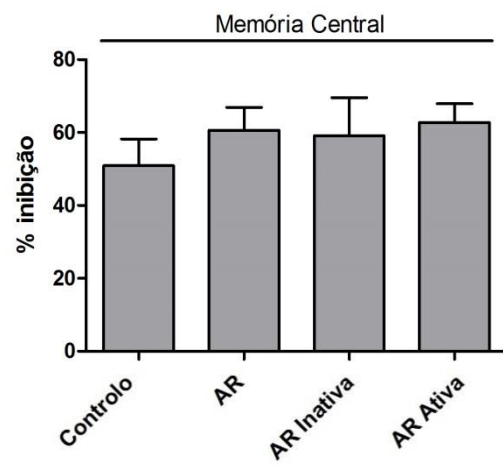
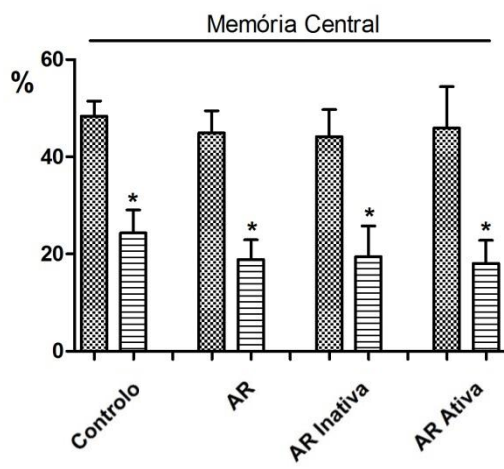
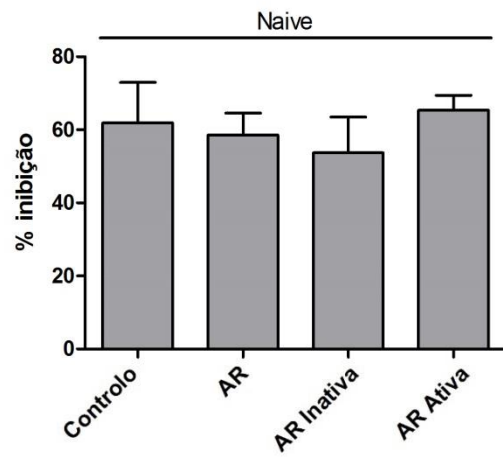
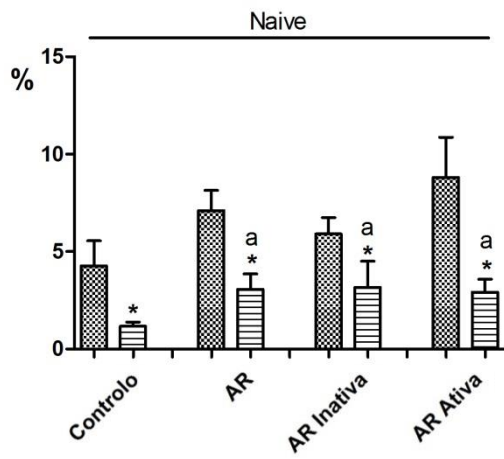
A frequência de células a produzir a citocina é idêntica entre os grupos, realçando apenas uma diminuição da frequência, nas células efetoras, entre os doentes com a doença inativa e ativa.

Em relação aos resultados referentes à quantidade relativa de TNF- α por célula, apresentados na **Figura 20 I.**, verificou-se que existiu uma diminuição da produção da citocina, quando em contacto com MSCs, com diferenças estatísticas em todos os compartimentos de maturação, exceto nas células naïve.

As células que não tiveram contacto com MSCs, não registaram diferenças de produção entre os diferentes grupos.

As células efetoras apresentaram uma maior produção de TNF- α enquanto as células naïve produziram a citocina em menor quantidade.





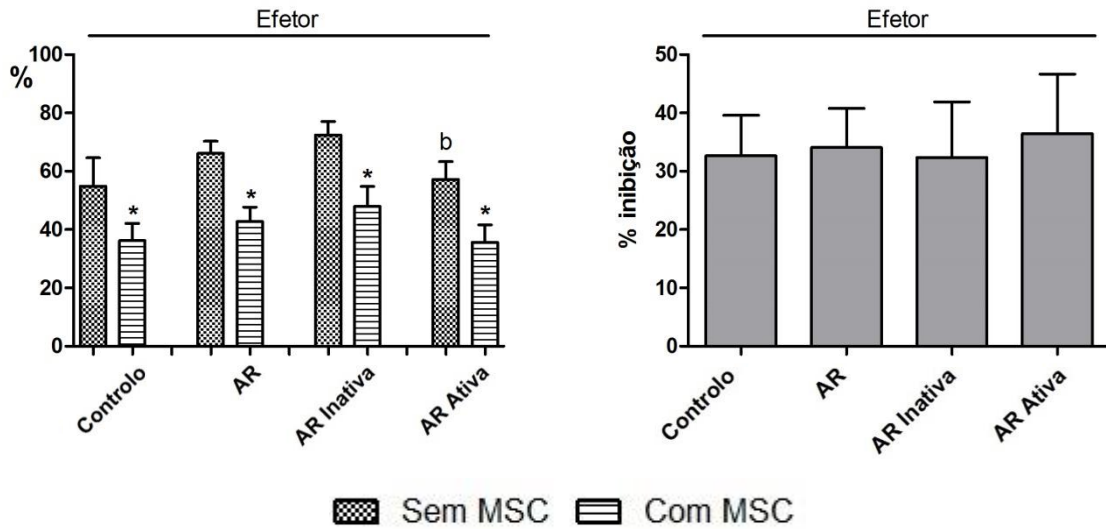


Figura 17 Representação gráfica da frequência de células T CD4⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de TNF- α , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição. *) Sem MSC *versus* Com MSC, $p < 0,05$, Wilcoxon; a) Controlo *versus* AR/AR Inativa/AR Ativa, $p < 0,05$; b) Inativo *versus* Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 6; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

Tal como na figura anterior, as células T CD8⁺ (**Figura 18**) foram sensíveis aos efeitos imunomodulatórios das MSCs, observando-se uma diminuição da frequência de células produtoras de TNF- α com diferenças estatísticas em todos os compartimentos e grupos.

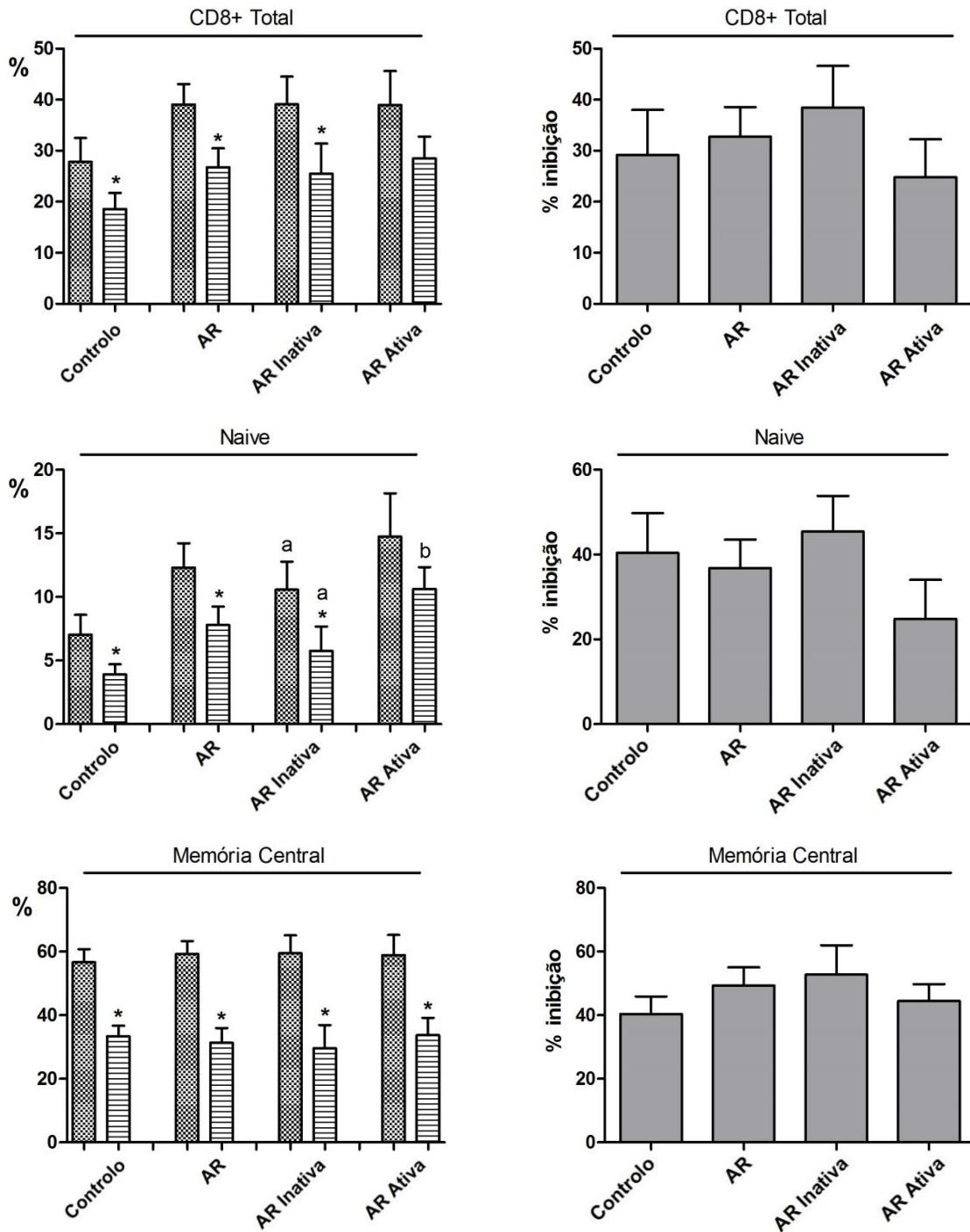
As células de memória efetora e efetoras do grupo AR inativa foram as mais sensíveis aos efeitos das MSCs, apresentando diferenças na percentagem de inibição, quando comparadas com as mesmas do grupo controlo. Para além disso existiu também uma diminuição da percentagem de inibição relevante, nas células de memória efetora, entre os doentes com AR inativa e ativa.

As células T CD8⁺ dos doentes com a AR ativa aparentaram ser os que têm células menos sensíveis aos efeitos imunomoduladores.

Na **Figura 20 II.**, verificou-se uma diminuição da produção de TNF- α por célula T CD8⁺ após o contacto com MSCs com diferenças estatísticas em todos os grupos e compartimentos.

Não se registraram alterações na produção basal da citocina quando comparados os diferentes grupos, apenas uma ligeira diminuição nas células naïve do grupo AR, mas sem significado estatístico.

Tal como nas células anteriores, as células T CD8⁺ naïve são as que apresentaram uma menor produção de TNF- α , enquanto as células efetoras exibiram uma maior produção.



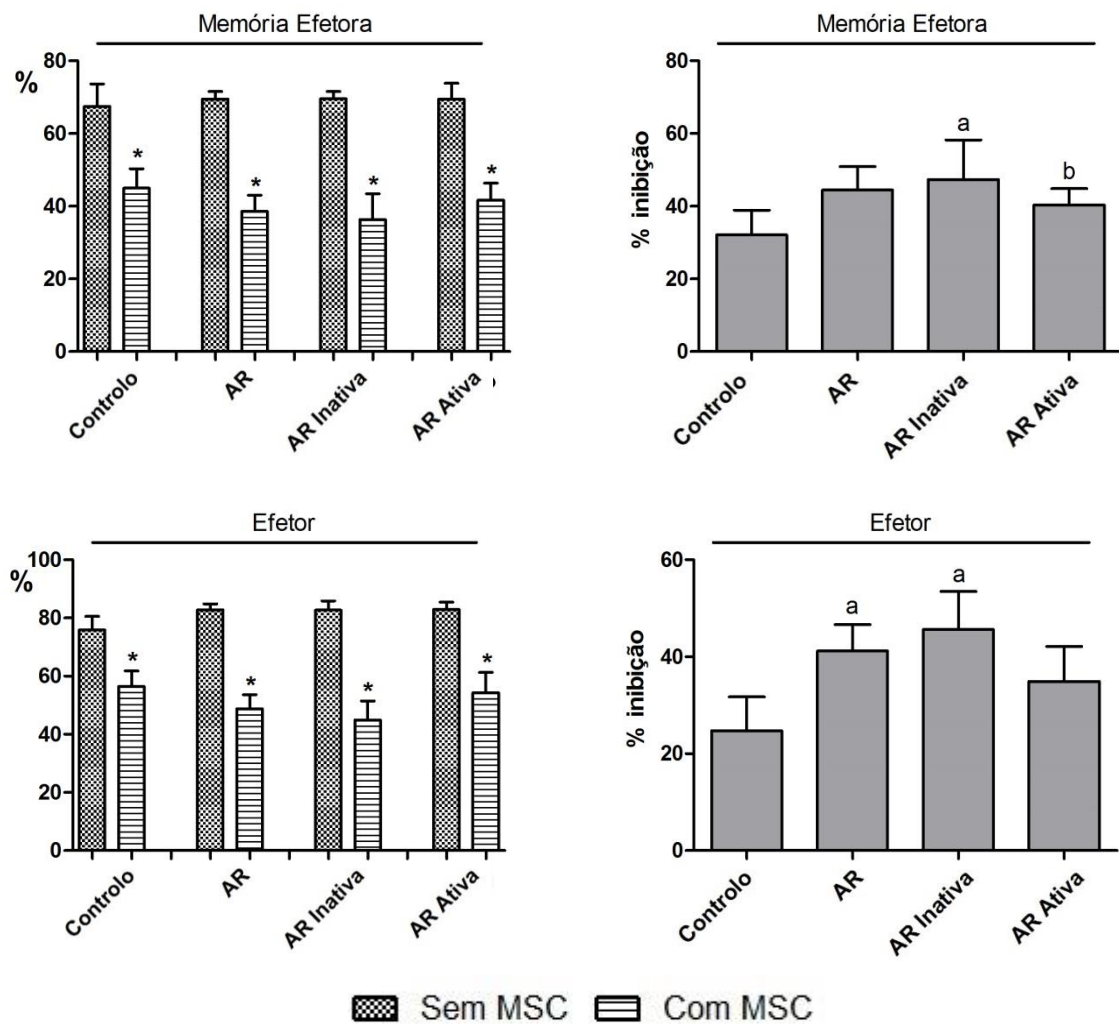


Figura 18 Representação gráfica da frequência de células T CD8⁺ assim como dos seus compartimentos, produtores de TNF- α , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição. *) Sem MSC *versus* Com MSC, $p < 0,05$, Wilcoxon; a) Controlo *versus* AR/AR Inativa/ AR Ativa, $p < 0,05$; b) Inativo *versus* Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 6; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

Analisando os resultados obtidos individuo por individuo (**Figura 19**), verificou-se que existiu uma maior variação de resultados nas células T CD8⁺, com apenas 80% dos indivíduos com a AR ativa a responder como esperado ao ensaio *in vitro*.

No geral, as células T CD4⁺ são as que apresentam resultados mais favoráveis, sendo mais sensíveis ao efeito das MSCs.

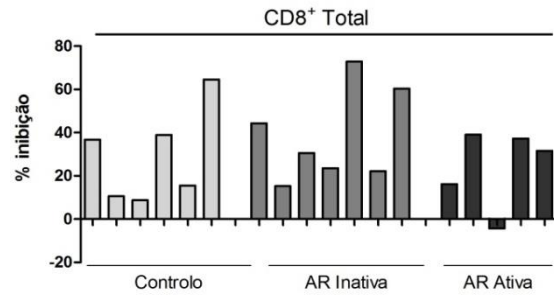
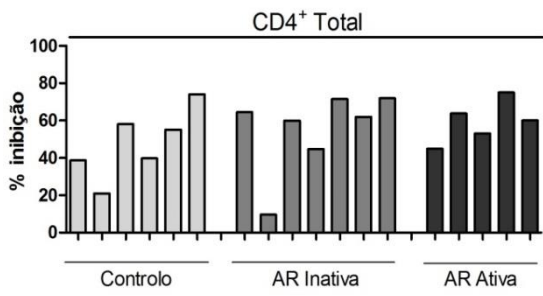
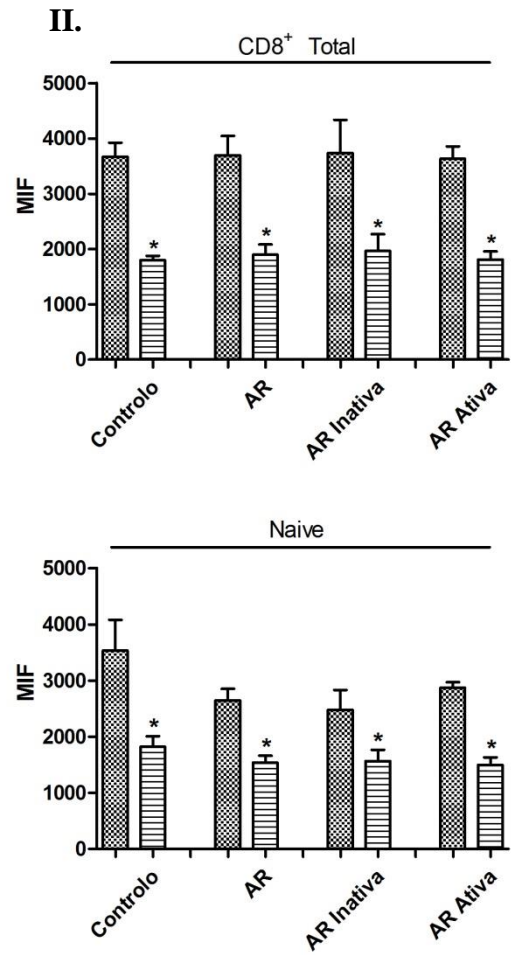
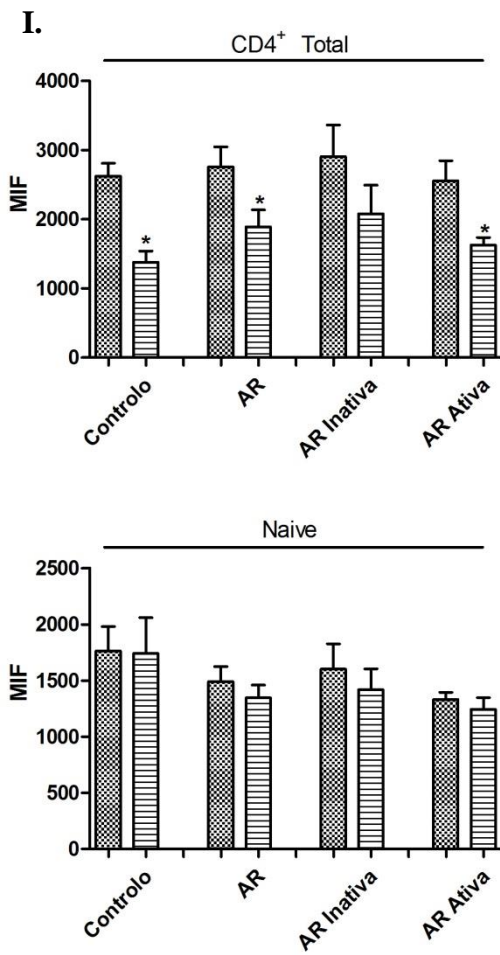


Figura 19 Representação gráfica da percentagem de inibição de TNF- α das células T CD4⁺ e células T CD8⁺, do grupo controlo e grupo AR, individuo a individuo



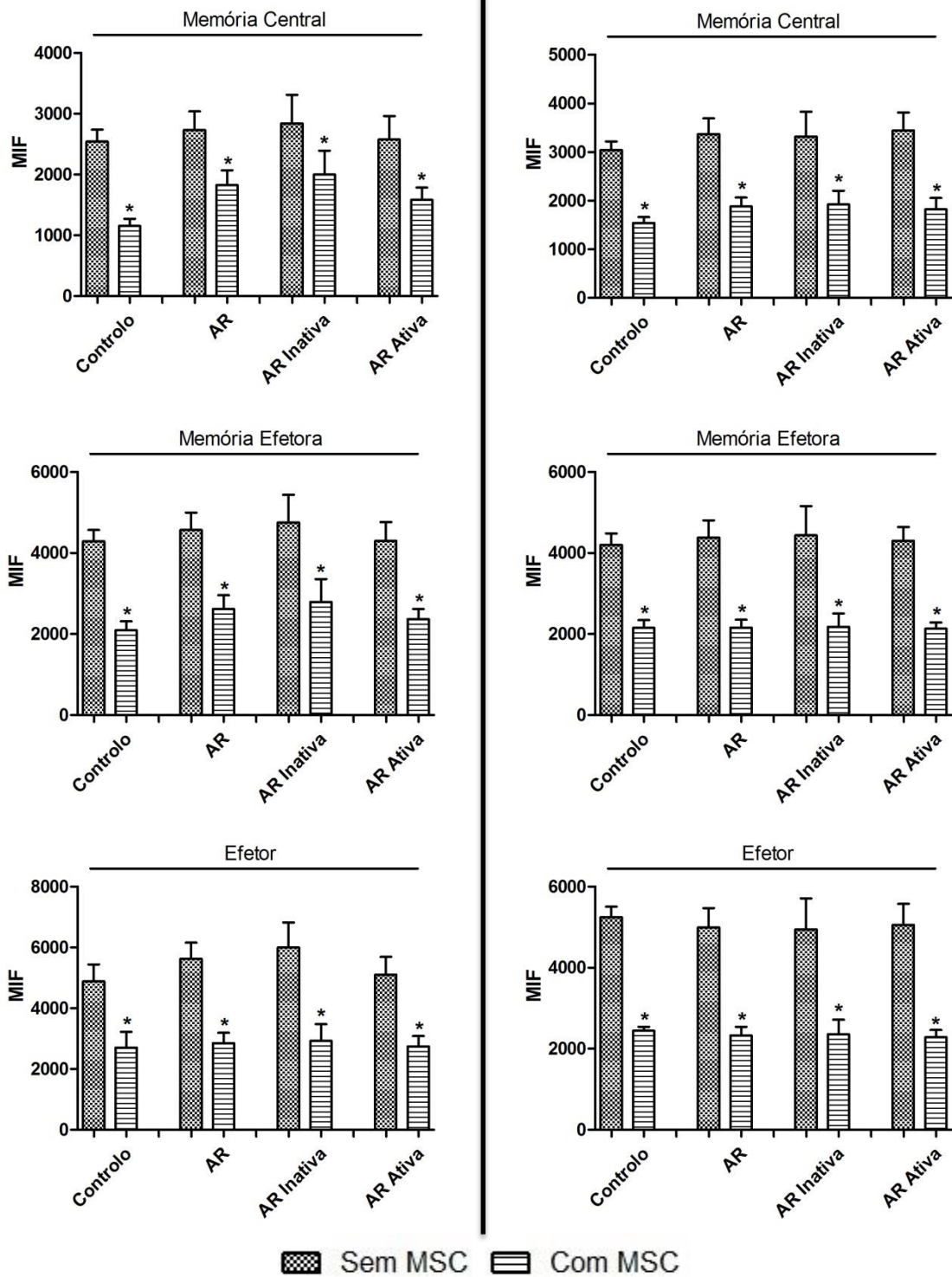


Figura 20 Representação gráfica da MIF de TNF- α pelas I. células T CD4⁺ e II. Células T CD8⁺ assim como dos seus compartimentos, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC *) Sem MSC versus Com MSC, $p < 0,05$, Wilcoxon; a) Controlo versus Doentes/Inativo/Ativo, $p < 0,05$; b) Inativo versus Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 6; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

D. Interleucina 17

Na **Figura 21**, observou-se que a frequência de células T produtoras de IL-17 é bastante inferior comparativamente às citocinas anteriores. Verificou-se uma maior frequência de células Th17 nos doentes com AR inativa, e uma frequência bastante semelhante ao grupo controlo nas restantes células.

Apesar da baixa frequência de células a produzir IL-17, após a adição das MSCs, observou-se um decréscimo desta mesma frequência, com significado estatístico em todas as células e grupos.

Não existiram diferenças na percentagem de inibição do grupo AR relativamente ao grupo controlo, observando-se apenas uma diminuição na percentagem nas células Tc17 dos doentes com AR comparativamente às Th17.

Em relação às células que produziram simultaneamente IL-17 e TNF- α , observou-se uma diminuição da frequência celular quando se adicionou MSCs à cultura, com as células dos doentes ativos a apresentarem uma maior resistência aos efeitos imunomoduladores.

Tal como nos resultados anteriores, não existiram diferenças na percentagem de inibição, exceto nas células Tc dos doentes com a doença inativa.

Relativamente à **Figura 23 I.**, não se observaram diferenças na produção de IL-17 por célula, antes e após a co-cultura com MSCs. Notou-se até um aumento da produção nas células T CD8⁺ dos doentes com AR inativa e ativa, o que não se observou no grupo controlo.

Existiu um aumento significativo na produção basal de IL-17 pelas células T CD4⁺ no grupo com AR inativa comparativamente às mesmas células no grupo controlo, e uma diminuição da produção da citocina nas células T CD4⁺ do grupo dos doentes com a doença ativa, relativamente ao grupo AR inativa.

Em relação à produção simultânea de IL-17 e TNF- α (**Figura 23 II.**) registou-se uma diminuição significativa da produção de TNF- α por célula, em todas as células e grupos, após o contacto com MSCs. Já a produção sem a presença de MSCs não apresentou variações de grupo para grupo nem entre células.

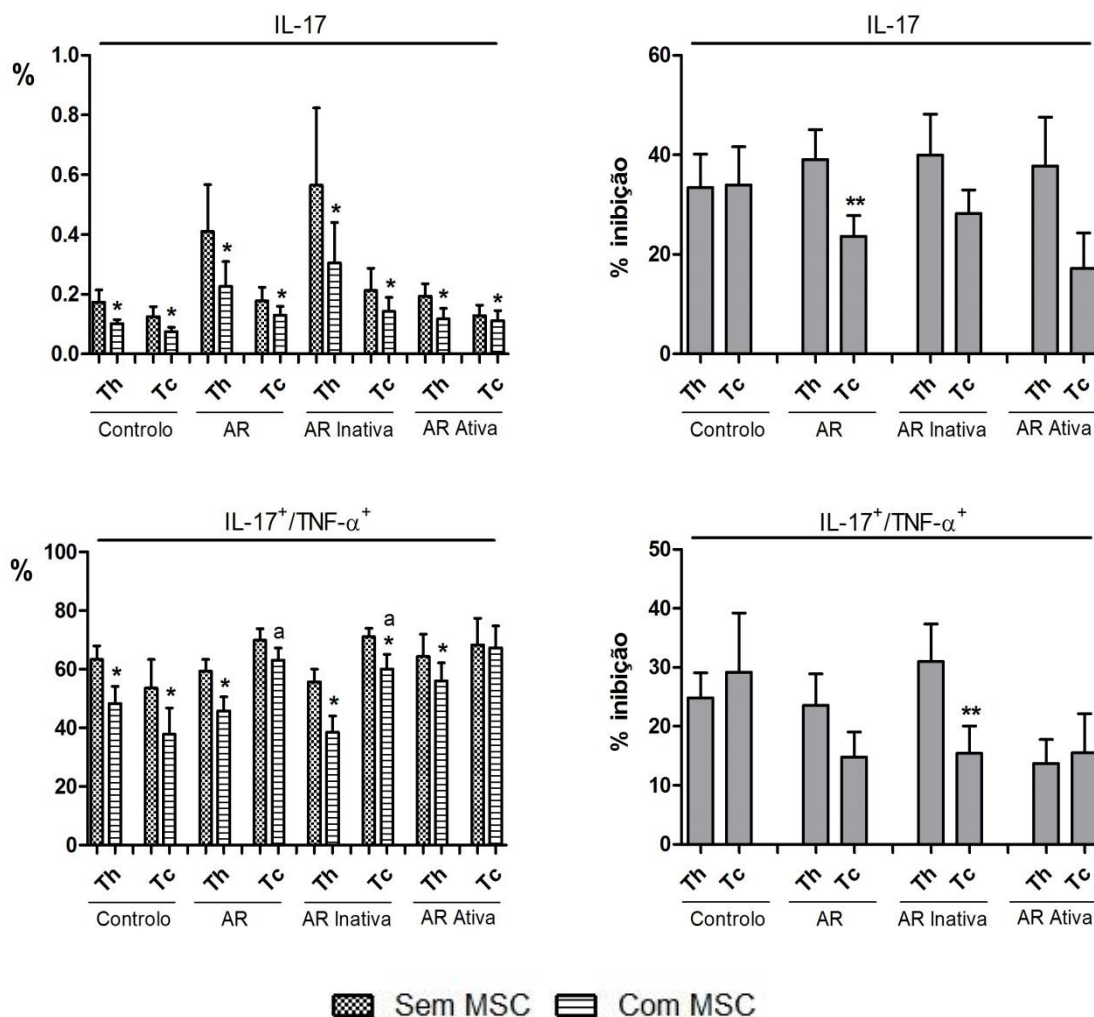


Figura 21 Representação gráfica da frequência de células T Th17 e Tc17 produtoras de IL-17 e TNF- α , após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição. *) Sem MSC *versus* Com MSC, $p < 0,05$; **) Th *versus* Tc, $p < 0,05$. Wilcoxon; a) Controlo *versus* AR/AR Inativa/ AR Ativa, $p < 0,05$; b) Inativo *versus* Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo IL-17) = 8; n (controlo IL-17/TNF- α) = 6; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

Observando a **Figura 22**, verificou-se que as células produtoras de IL-17 apresentaram oscilações nos resultados, em especial nas células T CD8⁺. Em ambas as células existe um potenciamento da produção de IL-17 após o contacto com as MSCs, no grupo AR inativa nas células T CD4⁺ e no grupo AR ativas nas células T CD8⁺.

Relativamente à frequência de células a produzir simultaneamente IL-17 e TNF- α verificou-se que nas células T CD4⁺ existiu uma inibição em todos os grupos, o que não

aconteceu nas células T CD8⁺. O grupo AR ativa apresentou 40% dos indivíduos a aumentar a frequência de células produtoras das citocinas após contacto com MSCs, enquanto os outros grupos apresentaram inibições relativamente baixas.

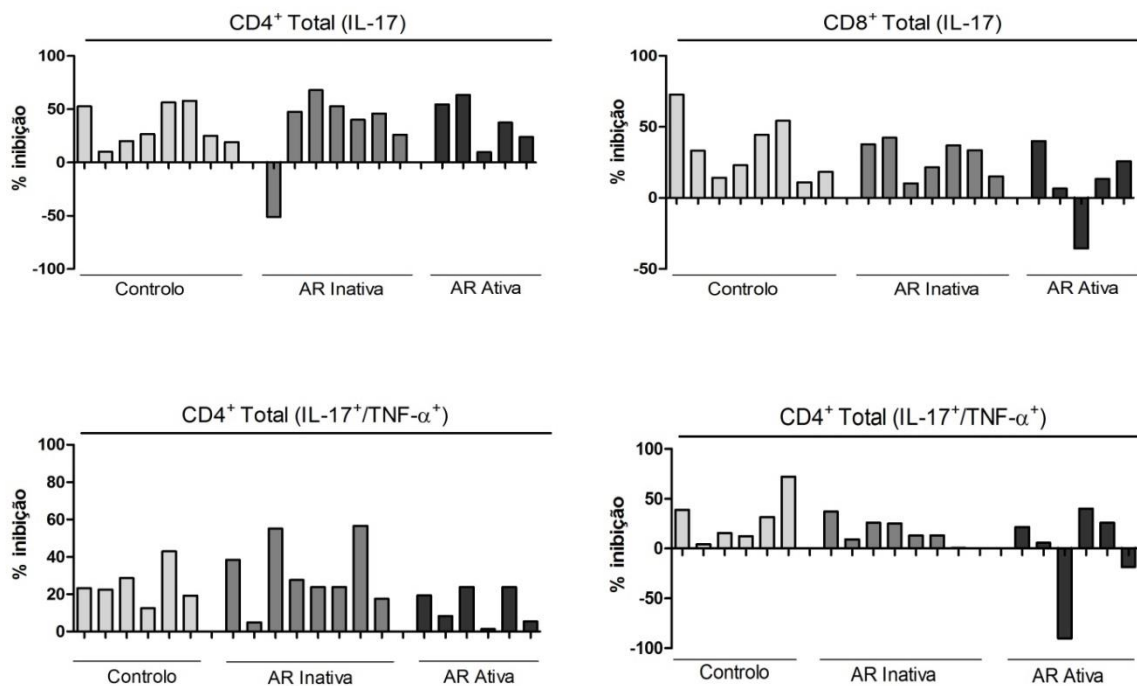
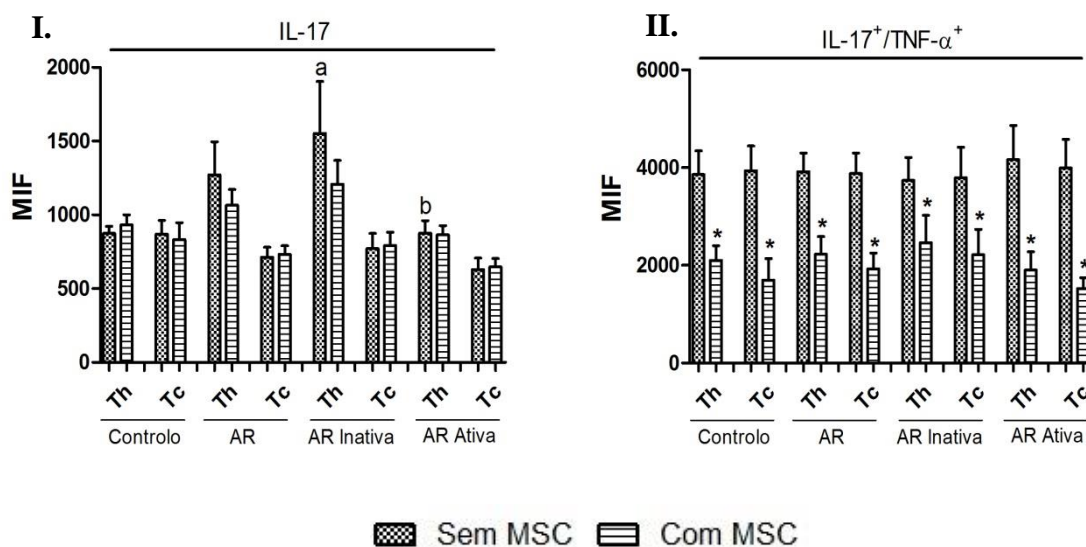


Figura 22 Representação gráfica da percentagem de inibição de IL-17 e TNF- α das células T CD4⁺ e células T CD8⁺, do grupo controlo e grupo AR, indivíduo a indivíduo.



▨ Sem MSC ▨ Com MSC

Figura 23 Representação gráfica da MIF de I. IL-17 e II. IL-17 e TNF- α pelas células T CD4⁺ e células T CD8⁺, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC *) Sem MSC *versus* Com MSC, p<0,05, Wilcoxon; a) Controlo *versus* Doentes/Inativo/Ativo, p<0,05; b) Inativo *versus* Ativo, p<0,05. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. . n (controlo IL-17) = 8; n (controlo IL-17/TNF- α) = 6; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

E. Interleucina 6

Analisando a **Figura 24**, verificou-se que após co-cultura com MSCs existiu uma diminuição da frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-6, com significado estatístico no grupo de AR inativa, que como consequência, foi o grupo que apresentou uma maior percentagem de inibição. As células do grupo controlo foram as mais resistentes ao efeito imunomodulador das MSCs.

Antes do contacto com MSCs, a frequência de células a produzir IL-6 aumentou no grupo da AR inativa, e baixou para valores semelhantes ao controlo nos doentes com AR ativa.

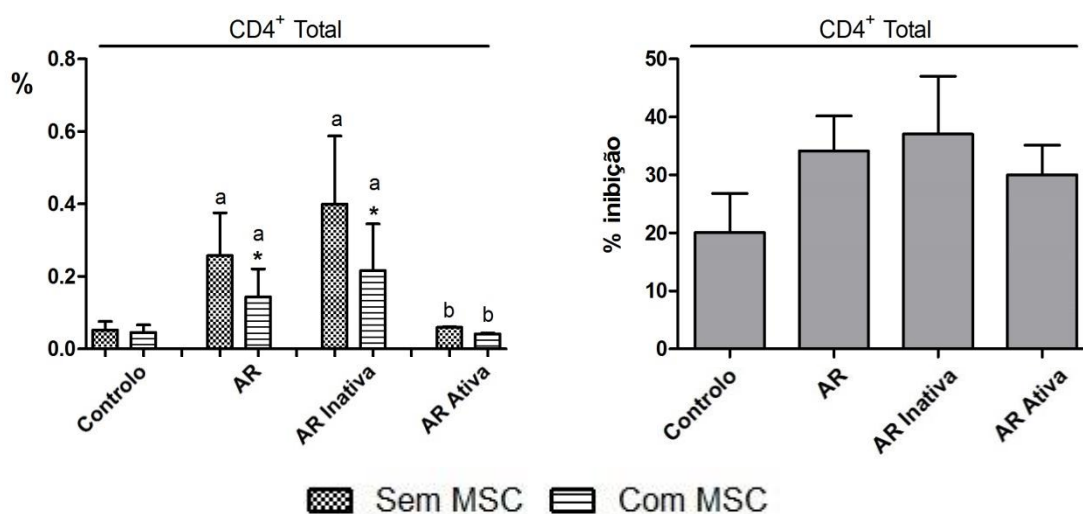


Figura 24 Representação gráfica da frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-6, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição. *) Sem MSC *versus* Com MSC, p<0,05. Wilcoxon; a) Controlo *versus* AR/AR Inativa/ AR Ativa, p<0,05; b) Inativo *versus* Ativo, p<0,05. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 8; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

Na **Figura 25** observou-se alguma variabilidade de resultados, observou-se que nas células T CD4⁺ existiu inibição da frequência de células produtoras de IL-6 em todos os indivíduos testados, exceto no controlo onde 13% dos indivíduos não sofreu qualquer inibição.

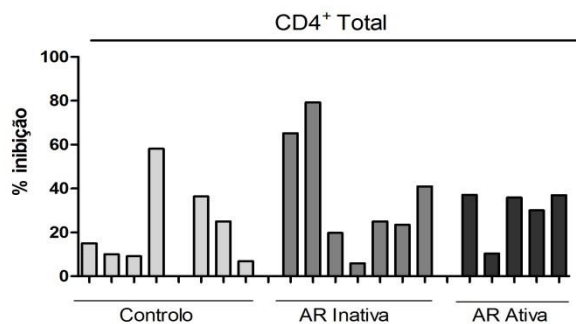


Figura 25 Representação gráfica da percentagem de inibição de IL-6 das células T CD4⁺ do grupo controlo e grupo AR, indivíduo a indivíduo.

F. Interleucina 9

A frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-9 (**Figura 26**) seguiu o mesmo padrão dos resultados anteriores relativos à produção de IL-6. Registou-se um aumento da frequência de células produtoras de IL-9 (antes do contacto com MSCs) no grupo de doentes com AR inativa e uma produção bastante semelhante nos controlos e doentes com AR ativa. Observou-se igualmente uma diminuição depois do contacto com MSCs, de células produtoras de IL-9, em todos os grupos, com o grupo controlo a ser mais resistente à MSC e os doentes com a AR inativa a serem os mais sensíveis.

Em relação às células T CD8⁺, existiu uma diminuição da frequência de células produtoras de IL-9, após co-cultura com MSCs. O grupo AR ativa não apresentou diferenças significativas, registando apenas uma inibição de 10%, tornando-se assim o grupo menos sensível.

Neste caso, ambos os subtipos de AR apresentaram uma maior frequência de células a produzir IL-9 relativamente ao grupo controlo, antes do contacto com MSC.

O grupo que melhor reagiu à imunomodulação das MSC, tal como nas células T CD4⁺, voltou a ser o grupo de AR inativa.

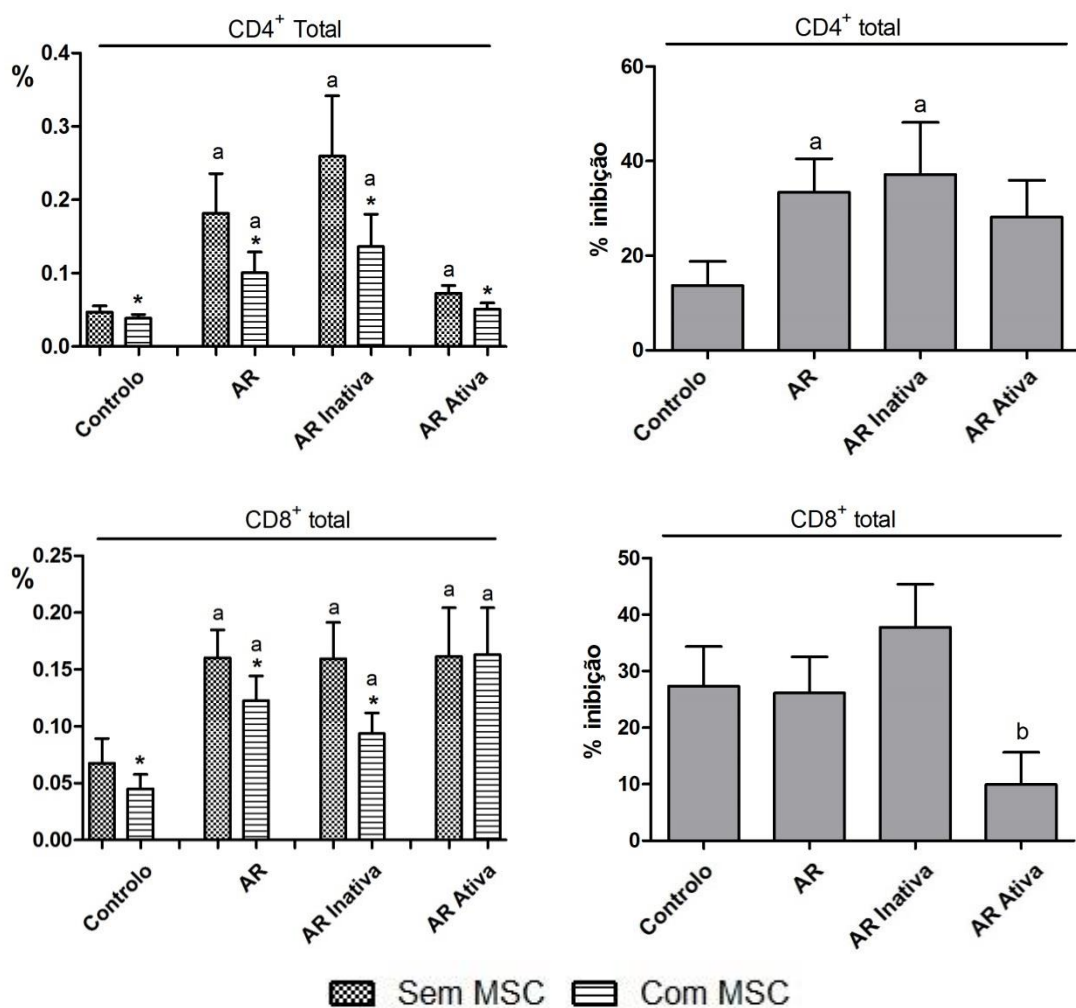


Figura 26 Representação gráfica da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-9, após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC e respetivas percentagens de inibição. *) Sem MSC versus Com MSC, $p < 0,05$. Wilcoxon; a) Controlo versus AR/AR Inativa/ AR Ativa, $p < 0,05$; b) Inativo versus Ativo, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 8; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

Relativamente aos resultados individuais da inibição de IL-9 pelas MSCs (**Figura 27**), verificou-se que as células T CD4⁺, do grupo controlo, foram inibidas em apenas 75% dos indivíduos testados. Já o grupo de doentes com AR inativa e ativa, sofreu sempre inibição por parte das MSCs.

A frequência de células T CD8⁺ foi inibida 100% no grupo controlo e no grupo AR inativa, e os doentes com AR ativa sofreram uma inibição de 80%.

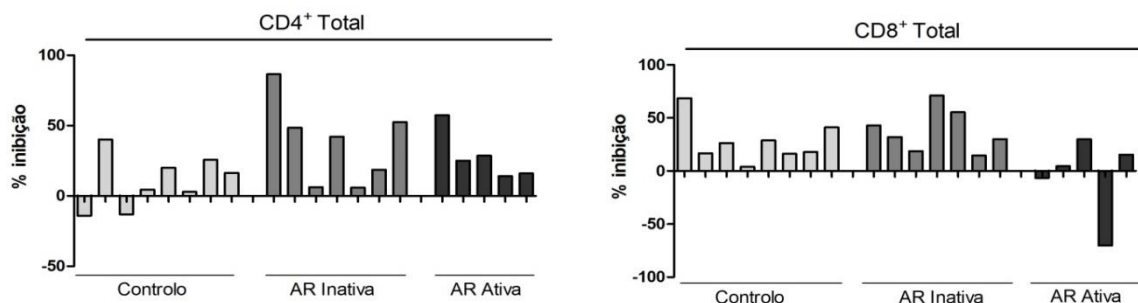


Figura 27 Representação gráfica da percentagem de inibição de IL-9 das células T CD4⁺ e células T CD8⁺, do grupo controlo e grupo AR, indivíduo a indivíduo.

2. Estudo da expressão génica de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺, CD8⁺ e T reguladoras

A. Interleucina 10

Na **Figura 28**, resultados relativos à expressão de mRNA de IL-10, observou-se que depois do estímulo com PMA e ionomicina ocorreu um aumento da expressão de mRNA de IL-10 pelas células comparativamente às que não receberam estímulo.

Relativamente às células T CD4⁺, não se registaram variações na expressão de mRNA de IL-10 entre o grupo controlo e o grupo AR, após estímulo celular. Dentro do grupo de AR, observou-se uma diminuição da expressão de mRNA de IL-10 no grupo de AR ativa, com significado estatístico, quando comparado com o grupo de AR inativa. Após co-cultura com MSCs verificou-se um aumento da expressão de mRNA de IL-10 em todos os grupos exceto no grupo de doentes com AR ativa.

Em relação à expressão de mRNA de IL-10 pelas células T CD8⁺, também não se verificaram diferenças entre os diversos grupos, após estimulação com PMA e ionomicina. Depois do contacto com MSCs, verificou-se um aumento do mRNA da citocina, em todos os grupos, apesar de não se observarem diferenças estatísticas.

Nas células Treg, novamente não foram observadas diferenças na expressão de mRNA de IL-10 entre grupos, após estímulo celular. Após contacto com MSCs observou-se uma diminuição do mRNA de IL-10 em todos os grupos.

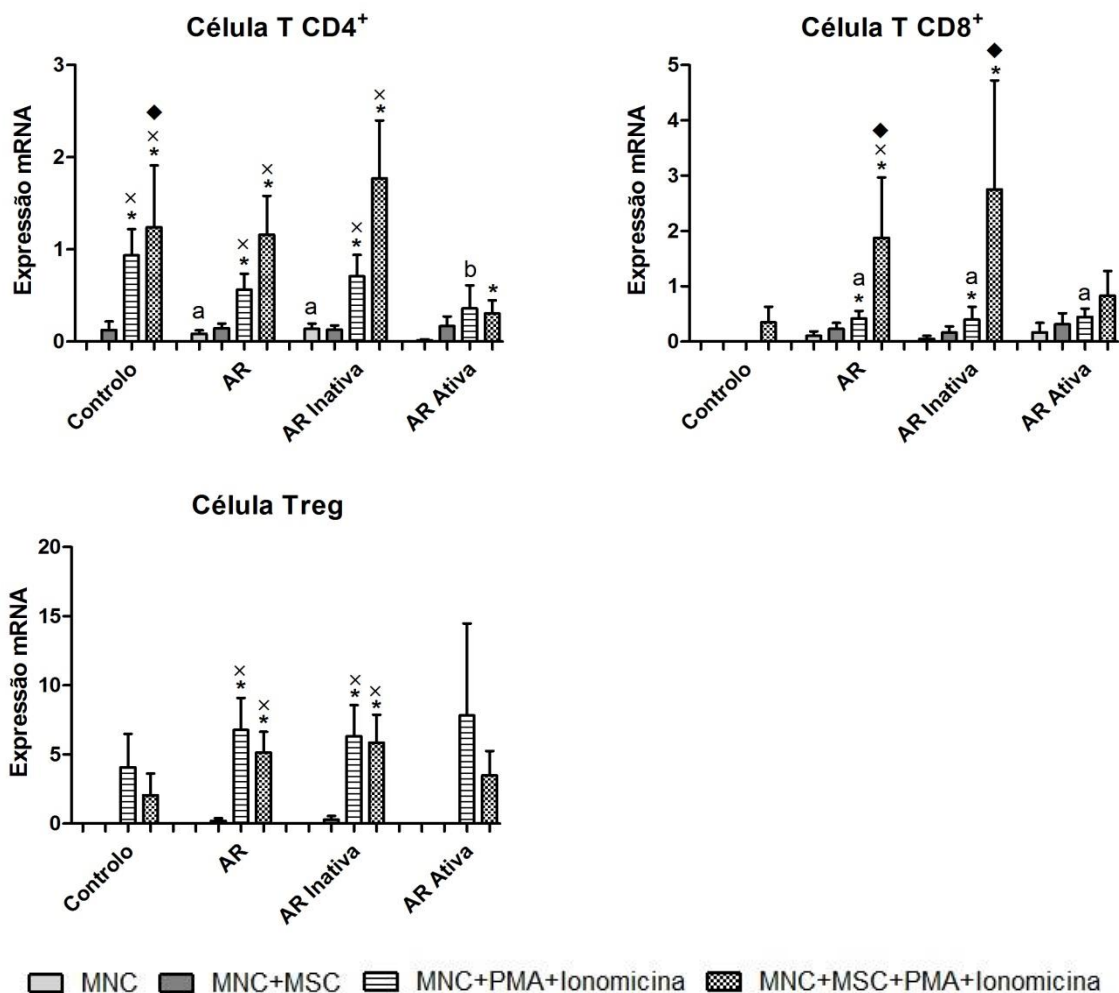


Figura 28 Representação gráfica da expressão de mRNA de IL-10 pelas células T CD4⁺, células T CD8⁺ e células T reguladoras, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC. *) Diferenças estatísticas contra MNC, p<0,05; x) Diferenças estatísticas contra MNC+MSC, p<0,05; ♦) Diferenças estatísticas contra MNC+PMA+Ionomicina, p<0,05; Friedmann e Wilcoxon; a) Diferenças estatísticas contra grupo controlo, p<0,05; b) AR Inativa *versus* AR Ativa, p<0,05. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 5; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

B. Fator de Crescimento Transformante- β

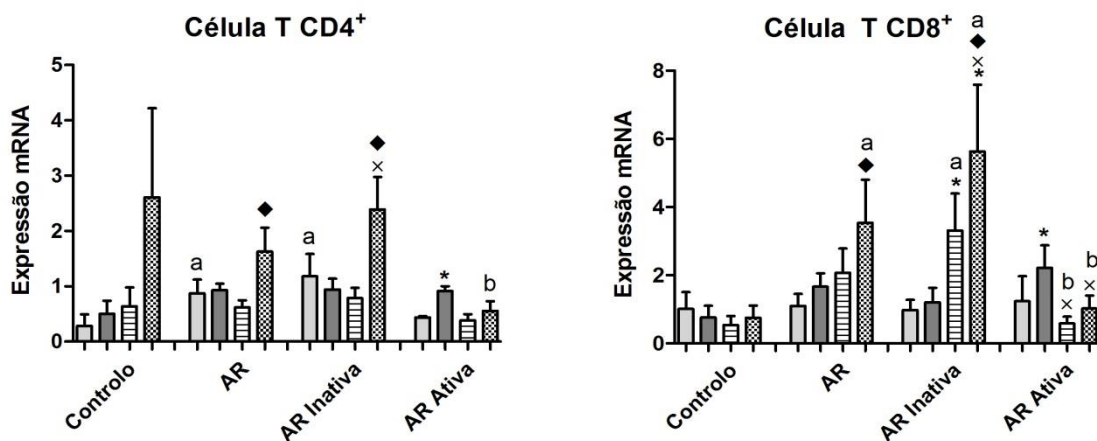
Na **Figura 29** são apresentados os resultados relativos à expressão de TGF- β . Relativamente às células T CD4⁺, observou-se um aumento significativo da expressão basal de mRNA de TGF- β (MNC) no grupo de doentes com AR inativa, comparativamente ao grupo de indivíduos saudáveis. Após estímulo com PMA e ionomicina não se observaram diferenças, entre grupos. Na condição MNC+MSC+PMA+ionomicina, registou-se um aumento da expressão de mRNA em todos os grupos, apesar de só se atingir significado estatístico no grupo de AR inativa.

Nas células T CD8⁺ a expressão basal de mRNA de TGF- β manteve-se constante em todos os grupos, mas após estímulo celular houve um aumento significativo no grupo de AR inativa, quando comparada com o grupo controlo e uma diminuição significativa grupo de AR ativa quando comparada com o estado inativo da doença.

Após contacto com MSCs, as células T CD8⁺ apresentaram o mesmo comportamento que as células anteriores, registando um aumento da produção mRNA de TGF- β em todos os grupos, com significado estatístico no grupo de AR inativa.

A expressão basal de mRNA de TGF- β nas células Treg, quando comparada com o grupo de indivíduos saudáveis, atingiu um aumento significativo no grupo de doentes com a doença inativa. Após estímulo observou-se um aumento não significativo também neste mesmo grupo.

Por fim, após co-cultura com MSCs, observou-se um aumento da expressão de mRNA de TGF- β no grupo controlo e no grupo de doentes com AR ativa e uma diminuição no grupo de AR inativa.



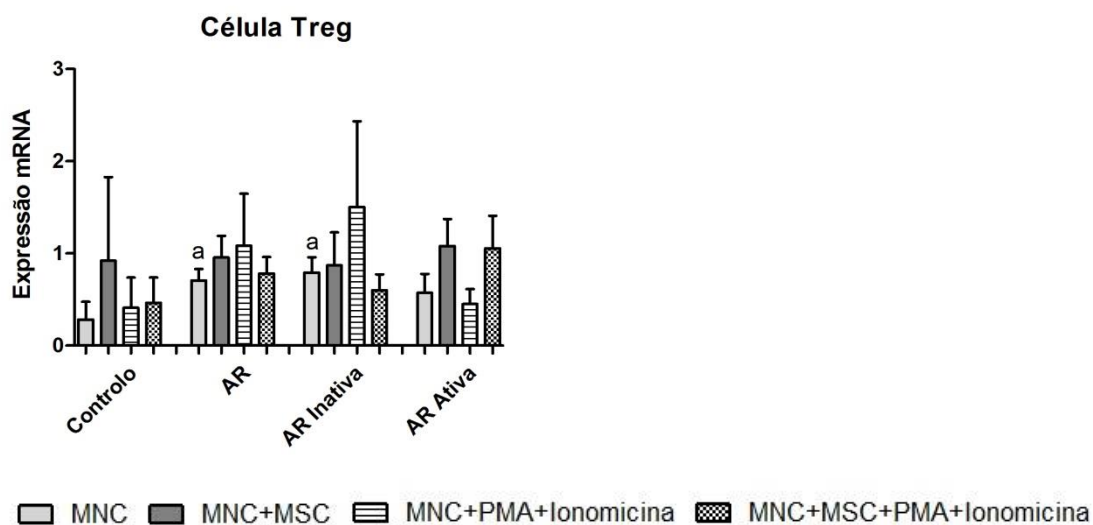


Figura 29 Representação gráfica da expressão de mRNA de TGF- β pelas células T CD4⁺, células T CD8⁺ e células T reguladoras, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC. *) Diferenças estatísticas contra MNC, $p < 0,05$; ×) Diferenças estatísticas contra MNC+MSC, $p < 0,05$; ♦) Diferenças estatísticas contra MNC+PMA+Ionomicina, $p < 0,05$; Friedman e Wilcoxon; a) Diferenças estatísticas contra grupo controlo, $p < 0,05$; b) AR Inativa *versus* AR Ativa, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 5; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

C. CTLA-4

Na **Figura 30**, pode observar-se um aumento significativo da expressão basal de mRNA de CTLA-4 (MNC) no grupo AR inativa, relativamente ao grupo controlo. Relativamente à condição MNC, após estímulo com PMA e ionomicina, verificou-se um aumento constante com todos os grupos. NA condição MNC+MSC+PMA+ionomicina, no grupo controlo e grupo de AR inativa registaram um aumento da expressão de CTLA-4 e no grupo de AR ativa, observou-se uma diminuição dessa mesma expressão.

Nas células T CD8⁺, não se verificou diferenças na expressão basal da proteína entre os diferentes grupos em estudo. Após estímulo celular, observou-se um aumento em todos os grupos, mas mais pronunciado no grupo dos doentes com AR. Após co-cultura com MSCs, em todos os grupos, foi observado um aumento da expressão de mRNA de CTLA-4, novamente mais acentuado no grupo dos doentes com AR.

Em relação as células Treg, observou-se um aumento da produção basal da proteína relativamente ao grupo controlo, mas sem atingir significado estatístico. Após estímulo celular, comparativamente à condição MNC, registou-se um aumento da expressão, e

também neste caso, mais marcado no grupo de doentes com AR. Na condição de MNC estimuladas e na presença de MSC, observou-se um aumento da expressão de mRNA de CTLA-4 em todos os grupos.

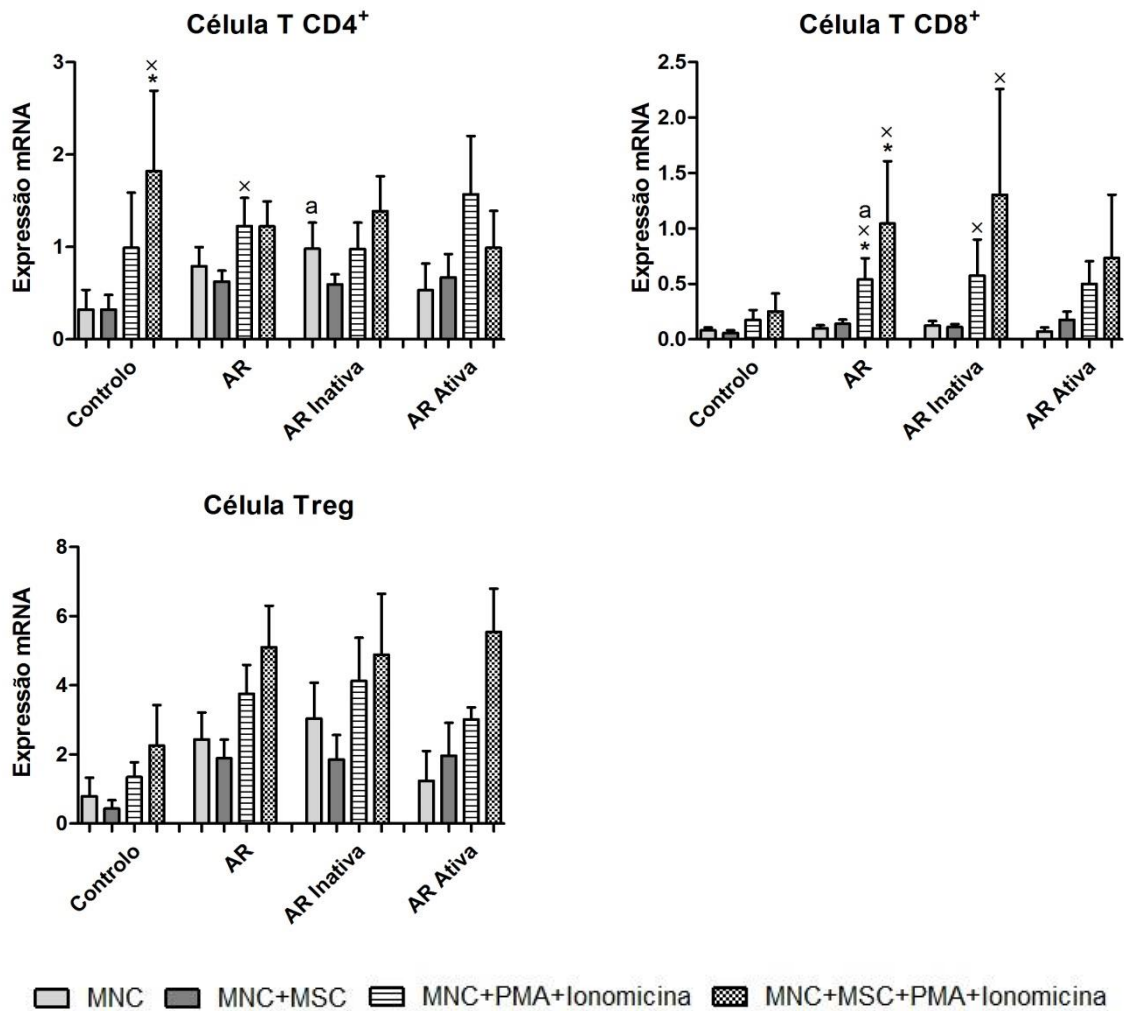


Figura 30 Representação gráfica da expressão de mRNA de CTLA4 pelas células T CD4⁺, células T CD8⁺ e células T reguladoras, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC. *) Diferenças estatísticas contra MNC, p<0,05; ×) Diferenças estatísticas contra MNC+MSC, p<0,05; ♦) Diferenças estatísticas contra MNC+PMA+Ionomicina, p<0,05; Friedmann e Wilcoxon; a) Diferenças estatísticas contra grupo controlo, p<0,05; b) AR Inativa *versus* AR Ativa, p<0,05. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 5; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

D. Interleucina 4

Na **Figura 31**, não se observou expressão basal de IL-4 em ambas as células T. Relativamente à expressão de mRNA de IL-4 pelas células T CD4⁺, após estímulo com PMA e ionomicina, esta manteve-se constante entre os diferentes grupos. Com a presença de MSCs, verificou-se um aumento da expressão de mRNA de IL-4 em todos os grupos exceto o grupo de AR ativa.

As células T CD8⁺ apresentaram um ligeiro aumento da expressão de mRNA de IL-4 na condição MNC+PMA+ionomicina no grupo de doentes com AR, relativamente ao grupo controlo, mas não foi atingido significado estatístico. Após contacto com MSCs observou-se uma diminuição da expressão de mRNA de IL-4 no grupo controlo e AR ativa, e um aumento no grupo AR inativa.

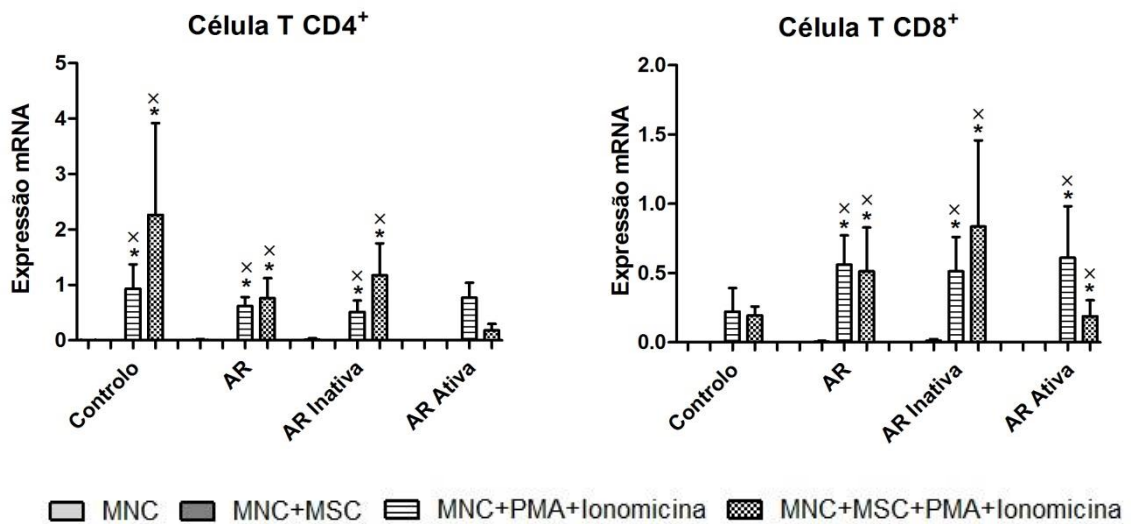


Figura 31 Representação gráfica da expressão de mRNA de IL-4 pelas células T CD4⁺ e células T CD8⁺, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC. *) Diferenças estatísticas contra MNC, $p < 0,05$; x) Diferenças estatísticas contra MNC+MSC, $p < 0,05$; ♦) Diferenças estatísticas contra MNC+PMA+Ionomicina, $p < 0,05$; Friedman e Wilcoxon; a) Diferenças estatísticas contra grupo controlo, $p < 0,05$; b) AR Inativa *versus* AR Ativa, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 5; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

E. Foxp3

Na **Figura 32**, expressão de mRNA de Foxp3 nas células Treg, observou-se uma diminuição da expressão basal de Foxp3 (MNC) no grupo dos doentes com AR quando comparados com o grupo controlo. Após estímulo com PMA e ionomicina e comparativamente às células não estimuladas, observou-se uma diminuição da expressão de mRNA de Foxp3, em todos os grupos estudados. Depois do contacto com MSCs, verificou-se um aumento de Foxp3 no grupo controlo e AR ativa e uma diminuição no grupo AR inativa.

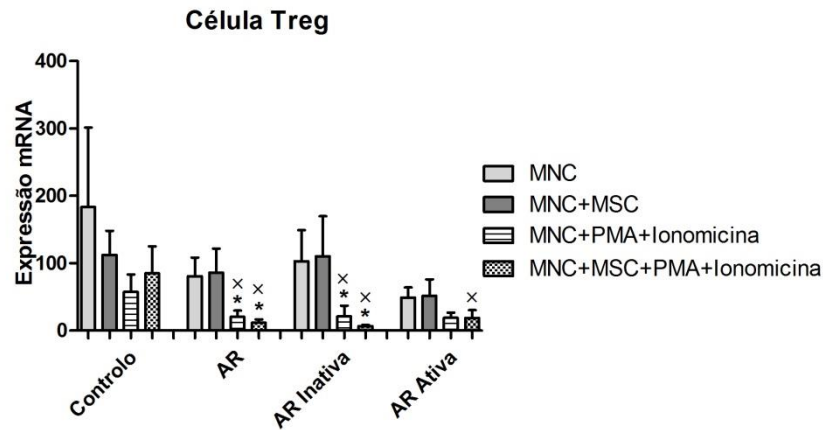


Figura 32 Representação gráfica da expressão de mRNA de Foxp3 pelas células T reguladoras, antes e após estímulo com PMA e Ionomicina, no grupo controlo e no grupo de doentes com AR, sem e com adição de MSC. *) Diferenças estatísticas contra MNC, $p < 0,05$; x) Diferenças estatísticas contra MNC+MSC, $p < 0,05$; ♦) Diferenças estatísticas contra MNC+PMA+Ionomicina, $p < 0,05$; Friedman e Wilcoxon; a) Diferenças estatísticas contra grupo controlo, $p < 0,05$; b) AR Inativa *versus* AR Ativa, $p < 0,05$. Kruskal Wallis e Mann-Whitney. n (controlo) = 5; n (doentes) = 12; n (inativo) = 7; n (ativo) = 5

» Discussão

Desde que as MSCs derivadas de medula óssea foram identificadas, têm suscitado grande interesse e crescente popularidade, particularmente na última década. (54)

Atualmente, a investigação baseada nas MSCs, para aplicações clínicas obteve grande atenção, não só devido à sua capacidade de auto-renovação e diferenciação, mas também devido ao seu efeito anti-inflamatório e imunomodulador em linfócitos, células dendríticas e outras células pró-inflamatórias. (45, 54)

As doenças autoimunes, como a AR, são grandes candidatas à terapia celular com MSCs, uma vez que é caracterizada pela presença de citocinas pró-inflamatórias que destroem as articulações. (40) Como esta doença apresenta um grupo heterogêneo de células T entre os seus compartimentos funcionais, torna-se urgente entender como as MSCs regulam estes compartimentos e em especial na AR, uma vez que os ensaios sobre esta doença são escassos.

Assim, neste estudo, foi avaliada a influência das MSCs no perfil de expressão de citocinas, nos compartimentos naïve, ME, MC e efector das células T CD4⁺ e CD8⁺, presentes no sangue periférico de indivíduos saudáveis e doentes com AR.

Depois da estimulação das células com PMA e ionomicina, a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-2 aumentou nos doentes com AR comparativamente ao grupo controlo, enquanto a frequência de células T CD8⁺ produtoras de IL-2 apresentou uma diminuição no grupo dos doentes com AR. Este aumento também foi observado nos diferentes compartimentos funcionais, apesar de não serem observadas diferenças estatísticas nas células T CD4⁺ efectoras e nas células T CD8⁺ naïve e MC. A produção da citocina teve também um aumento nos doentes com AR comparativamente aos indivíduos saudáveis.

A frequência de células e a produção de IFN- γ , tanto nas células T CD4⁺ como nas células T CD8⁺ apresentaram um aumento no grupo AR em comparação ao grupo controlo. É de realçar uma ligeira diminuição da frequência de células T CD4⁺ dos doentes com AR ativa em relação aos doentes com AR inativa, com significado estatístico nas células T efectoras.

Relativamente ao TNF- α , a sua produção e a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺, mantiveram-se semelhantes tanto no grupo controlo como no grupo de doentes com AR.

Seria de esperar um aumento da frequência de células T produtoras de IL-2 e IFN- γ na AR, uma vez que segundo a literatura, a AR é caracterizada por um infiltrado de células

T produtoras de citocinas pró-inflamatórias nas articulações. (22, 24) E que apresenta um desequilíbrio entre células Th1/Th2, o que pode ser responsável pelo desenvolvimento e progressão da doença. (13, 21, 30) Para além disso, o IFN- γ é importante na ativação de macrófagos e potencia a atividade das células NK estimulando a reação inflamatória na AR. (55, 56) A IL-2 estimula também a proliferação das células NK induzindo a sua atividade citolítica e estimula a proliferação de células B e a produção de anticorpos.

Uma vez que as principais citocinas produzidas pelas células Th1 são IL-2, IFN- γ e TNF- α (21), seria de esperar que a percentagem da frequência de células T produtoras de TNF- α estivesse aumentada nos doentes com AR, em vez de estar equiparada aos indivíduos saudáveis. A produção de TNF- α por parte dos doentes pode estar afetada devido à terapêutica usada, que interfere assim com a produção desta citocina. (57)

Os resultados mostraram que as MSCs inibiram tanto a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-2, IFN- γ e TNF- α , como a produção destas citocinas, em MNC estimuladas com PMA e ionomicina. O que vai ao encontro de outros ensaios já realizados, onde as MSCs mostraram induzir uma diminuição destas citocinas no meio extracelular. (18, 40, 43, 45) Esta inibição foi também visível nos diferentes compartimentos funcionais das células T, quer em CD4⁺ quer em CD8⁺, e nos diferentes grupos em estudo.

As células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-2 dos doentes com AR são as mais sensíveis aos efeitos inibitórios das MSCs, relativamente às mesmas dos indivíduos saudáveis, enquanto as células T produtoras de IFN- γ e TNF- α do grupo AR não mostraram variações relativamente ao grupo controlo, registando-se uma inibição acentuada em todos os grupos.

Apesar de não existirem variações relativamente ao grupo controlo, a percentagem de inibição da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ dos doentes com DAS>5 diminuiu relativamente às mesmas células dos doentes com DAS<5, com significado estatístico no compartimento efetor das células T CD8⁺, o mesmo foi observado no compartimento MC das células T CD8⁺ produtoras de TNF- α . Estes resultados podem significar que as MSCs são menos eficientes em estados mais avançados da doença, onde existe a presença exuberante de citocinas pró-inflamatórias.

Esta capacidade de imunomodulação, é em parte, mediada por fatores solúveis produzidos pelas MSCs, como o TGF- β , PGE2,IDO, HLA-G5, iNOS, HO-1 (43, 44, 48, 58) e/ou contacto celular e interação entre proteínas de superfície das MSCs.(44, 47)

Relativamente às outras citocinas pró-inflamatórias, as MSCs mostraram ter a capacidade de inibir a frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-17 e IL-9 e células T CD4⁺ produtoras de IL-6, tal como também já foi descrito por outros autores. (18, 59)

A frequência basal de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 sofreu um aumento no grupo de doentes com AR inativa e baixou para níveis semelhantes ao grupo controlo no grupo de doentes com AR ativa. Já as células T CD8⁺ apresentaram frequências idênticas em todos os grupos estudados. A produção de IL-17 por célula também não apresentou variações entre grupos, tanto nas células T CD4⁺ como CD8⁺.

As células T CD4⁺ produtoras de IL-6 e IL-9 apresentaram um comportamento semelhante, observou-se um aumento da frequência celular nos doentes com AR inativa, e uma diminuição para os níveis análogos ao do grupo controlo, nos doentes com AR ativa. Por fim as células T CD8⁺ produtoras de IL-9 aumentaram a sua frequência no grupo AR relativamente ao grupo de indivíduos saudáveis.

Comparativamente às citocinas do tipo Th1, citadas anteriormente, a percentagem destas citocinas (IL-17, IL-6 e IL-9) apresenta valores bastante inferiores.

Mais recentemente, a identificação de células T produtoras de IL-17 e células Treg presentes na AR, trouxe um novo paradigma caracterizado por um desequilíbrio Th17/Treg.(30)

Estudos já realizados, mostraram que as células Th17 aumentam em doentes com AR comparativamente a controlos saudáveis, apesar de não verificarem diferenças nas diferentes fases da doença (21). Além da IL-17 estimular macrófagos e outros linfócitos T a segregar mediadores inflamatórios, pode também induzir a expressão de RANKL, que é um requisito necessário para a ativação de osteoclastos e reabsorção óssea. As Th17 produzem principalmente IL-17, IL-6 e TNF- α , onde a IL-17 desempenha um papel importante na indução da inflamação por mediar a produção de outras citocinas e quimiocinas. (21, 30, 60)

A presença de uma maior percentagem de células Th17 nos doentes com DAS<5 relativamente aos doentes com DAS>5 pode ser devido à associação desta citocina à

inflamação crónica, onde Ferraccioli et al defendem 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. (61)

A IL-6 é uma citocina conhecida por apresentar propriedade pró e anti-inflamatórias. O papel desta citocina na inflamação foi confirmado por vários modelos animais em doenças autoimunes, onde o bloqueio da IL-6 prevenia o processo inflamatório. (62, 63) Na AR, a IL-6 em conjunto com o recetor α da IL-6 induz um largo espectro de eventos inflamatórios, envolvidos no aparecimento e progressão da doença, como a iniciação da fase aguda hepática, recrutamento de células inflamatórias para as articulações e promoção da destruição do osso e da cartilagem, sendo responsável também por algumas manifestações sistémicas. (30, 34) A IL-6 em combinação com outras citocinas é responsável pela diferenciação de células T naive em células Th17. (33)

Os efeitos biológicos de IL-9 ainda estão pobremente descritos. Esta citocina é produzida por Th9, Th2, Treg e subconjuntos de células Th17, desempenhando um papel importante na resposta imune contra helmintos e na inflamação alérgica. (17, 64) Apesar de ainda não terem sido realizados estudos em AR, o papel da IL-9 em Lúpus Eritematoso Sistémico, outra doença autoimune, já foi estudado e verificou-se que esta citocina apresenta efeitos pró-inflamatórios na doença, uma vez que tem a capacidade de expandir populações de Th17 e promover assim a inflamação. Por outro lado, têm também a capacidade de promover a produção de citocinas do tipo Th2, melhorar a função reguladora das células Treg e suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias. (65, 66)

Assim a percentagem da frequência de células T produtoras de IL-6 e IL-9 nos diferentes estadios da doença, pode ser influenciada por outras células, como as Th17.

Após co-cultura com MSCs, os resultados mostraram que a percentagem de inibição das células T CD4⁺ produtoras de IL-17 foi idêntica em todos os grupos em estudo. Enquanto as células T CD8⁺ produtoras da mesma citocina, foram mais resistentes no grupo de doentes com AR relativamente ao grupo de indivíduos saudáveis. De uma forma geral, as Th17 foram mais sensíveis aos efeitos inibitórios das MSCs quando comparadas com as Tc17. Quando se observou a produção de IL-17 por célula verificou-se uma diminuição da mesma nas células T CD4⁺ em todos os grupos em estudo, mas por outro lado, as MSCs potenciaram a produção de IL-17 nas células T CD8⁺.

Relativamente as células T CD4⁺ produtoras de IL-6, observou-se uma inibição em todos os grupos, mas as células dos doentes com AR foram as mais sensíveis aos efeitos inibitórios das MSCs.

As células T CD4⁺ produtoras de IL-9 seguiram a mesma linha que as células produtoras de IL-6, com uma inibição em todos os grupos, em especial no grupo de AR, com significado estatístico no grupo de AR inativa, comparativamente ao grupo controlo. A percentagem de inibição nas células T CD8⁺ produtoras de IL-9 foi semelhante nos diferentes grupos, apesar de se registar uma diminuição com significado estatístico, no grupo de doentes com AR ativa comparativamente ao grupo de doentes com AR inativa.

Apesar de não existirem ensaios relativos à inibição de IL-17 na AR, a diminuição da expressão de IL-17 e inibição da diferenciação das Th17, já foi observada em células T de ratinhos e humanos, um efeito atribuído à PGE2 e IL-10. (18, 67-69) No entanto, o efeito das MSCs nas células T que expressam IL-17 é controverso e alguns estudos mostraram que as MSCs promovem a expansão de Th17. (70-72)

A redução mediada pelas MSCs, da expressão de células T CD4⁺ produtoras de IL-6, está de acordo com a diminuição da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias avaliadas neste estudo, como, a percentagem de células T produtoras de IL-17. (36)

Ainda não foram realizados estudos relativamente à inibição da frequência de células T produtoras de IL-9 em AR, mas em ensaios efetuados em inflamações alérgicas, verificou-se que administrações sistémicas de MSCs eram benéficas devido ao aumento da IL-10 e diminuição de IL-4, IL-5 e IL-13. (73, 74)

Desta forma, este estudo teve resultados promissores, uma vez que as MSCs promoveram a diminuição das células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-9, tanto no grupo controlo como no grupo AR, abrindo assim novas possibilidades na investigação do uso de MSCs em terapia celular.

De uma forma geral, a produção das citocinas pró-inflamatórias e a frequência das células T que as produzem, são mais elevadas nos doentes com AR comparativamente aos indivíduos saudáveis, o que seria de esperar uma vez que como foi referido anteriormente, a AR é caracterizada por uma infiltração de células T autorreativas na membrana sinovial, que conseqüentemente, liberta uma quantidade excessiva de citocinas pró-inflamatórias. (22, 30)

Relativamente à expressão de mRNA de IL-10 pelas células T CD4⁺, CD8⁺ e Treg, observou-se um aumento de mRNA após estímulo com PMA e ionomicina, em todos os grupos, comparativamente às células que não receberam estímulo (MNC).

Comparativamente ao grupo controlo, verificou-se uma diminuição da expressão de mRNA de IL-10 na condição MNC+PMA+Ionomicina, nas células T CD4⁺ do grupo dos doentes com AR, enquanto a expressão nas células T CD8⁺ e Treg aumentou no grupo AR.

A IL-10 foi identificada pela primeira vez, como um fator inibidor solúvel expresso pelas células Th2, que poderia inibir a ativação e secreção de citocinas por células Th1. As suas funções na regulação do sistema imune são várias, como, modulação de APCs, diminuição da secreção de mediadores inflamatórios e indução da anergia de células T. (19) Mas mais recentemente, descobriu-se que também as células T CD8⁺ podem expressar IL-10, regulando os seus efeitos inflamatórios durante as infeções agudas e assim minimizar a doença imunopatológica. (75) Para além destas células, a IL-10 é expressa principalmente pelas células Treg, exercendo assim os seus efeitos supressivos.

Após co-cultura com MSCs, nas células T CD4⁺ observou-se um aumento da expressão de mRNA de IL-10 no grupo dos doentes com AR exceto no grupo AR ativa, comparativamente ao grupo controlo. Nas células T CD8⁺, verificou-se um aumento da expressão nos doentes com AR e nas células Treg observou-se o inverso, uma diminuição da expressão de mRNA de IL-10 no grupo AR.

Tal como descrito na literatura, as MSCs promovem o desenvolvimento de um fenótipo anti-inflamatório, através capacidade de aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e assim limitar a expansão de células T, (18, 43) inclusive em doentes com AR. (76)

A diminuição da expressão de IL-10 após contacto com MSCs pode ser explicada pois a literatura descreve que estas potenciam a diferenciação de células Treg e não um aumento das citocinas por elas produzidas, indicando assim que as células Treg podem desempenhar um papel importante de imunossupressão por meio de interação célula a célula e não por citocinas. (18, 21, 77)

Relativamente à expressão de mRNA de TGF- β , todas as células T se comportaram da mesma forma. Comparando a condição MNC com MNC+PMA+Ionomicina, observou-se que as células estimuladas aumentaram a expressão de TGF- β à exceção das células do

grupo de AR ativa. Não se obtiveram diferenças na expressão de mRNA pelas células T CD4⁺ estimuladas, nos diferentes grupos, enquanto as células T CD8⁺ e Treg apresentaram um aumento com exceção das células do grupo de doentes com AR ativa.

Tal como a IL-10, o TGF- β é também uma citocina anti-inflamatória, expressa principalmente pelas células Treg. (17, 19) Esta citocina pode induzir as células T CD4⁺ inativas a diferenciarem-se em células Treg e estudo recentes sugerem que o TGF- β pode também ser essencial para a diferenciação de células Th17. (21)

O aumento da expressão desta citocina em doentes com AR inativa e uma diminuição em doentes com AR ativa, pode estar relacionada com o facto de o TGF- β ajudar a manter o equilíbrio entre a diferenciação de Th17 e Treg numa fase precoce da doença, mas num estado avançado, a IL-6 estimula uma maior diferenciação de Th17 e inibe a diferenciação das Treg, fazendo assim decrescer a expressão de TGF- β . (21, 30)

Após contacto com MSCs, as células T CD4⁺ e CD8⁺ aumentaram a expressão de mRNA de TGF- β e as células Treg diminuíram a expressão no grupo de doentes com AR inativa e aumentaram nos doentes com AR ativa. Esta inibição já foi descrita em diversos estudos, onde as MSCs apresentam a capacidade de diminuir a expressão de TGF- β (18, 59, 77)

A expressão de mRNA de CTLA-4 aumentou nas células estimuladas com PMA e ionomicina comparativamente as células sem estimulação, em todos os grupos estudados.

Após estimulação, células T CD4⁺ não apresentaram variações na expressão de CTLA entre os diferentes grupos, enquanto as células T CD8⁺ e Treg aumentaram a expressão no grupo de AR relativamente ao grupo controlo.

O CTLA-4 é uma proteína imunorreguladora responsável pela redução da ativação das células T de memória e impede as células T de induzirem a diferenciação de células B em plasmócitos. (78) Esta proteína é tipicamente expressa na superfície das células Treg, e a sua ausência faz diminuir as capacidades supressoras das células Treg (13, 19)

Na condição MNC+MSC+PMA+Ionominica observou-se um aumento da expressão de mRNA de CTLA-4 em todas as células estudadas e grupos, exceto nas células T CD4⁺ do grupo AR ativa.

Já foi descrito que MSCs podem favorecer a diferenciação de células T CD4⁺ com presumível atividade regulatória, co-expressando a molécula CTLA-4. (51) O aumento da expressão desta molécula nas células T CD8⁺, significa que as MSCs têm a capacidade de

alterar o fenótipo das células para células CD8⁺ Treg, que apresentam capacidades reguladoras. (18, 19)

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória, potente inibidor da diferenciação das células Th17, produzida principalmente pelas células Th2 (17, 30) A diminuição da produção de IL-4 nas células T CD4⁺ estimuladas dos doentes com AR vai ao encontro do que é descrito na literatura, onde se vê o desequilíbrio entre Th1/Th2, com uma predominância de células do tipo Th1. (30) Contrariamente aos resultados das células anteriores, a expressão de mRNA de IL-4 pelas células T CD8⁺ sofre um aumento no grupo de AR, facto que também já foi descrito por Baek H. et al.. Segundo este estudo, estas células podem ser precursoras das células CD8⁺ Treg e o aumento destas células pode representar uma resposta à inflamação crónica das articulações. (79)

Como seria previsto, depois da co-cultura com MSCs, as células T CD4⁺ aumentaram a expressão de mRNA de IL-4, alterando o perfil Th1 para Th2. (18, 77)

Por fim, estudou-se a expressão de mRNA de Foxp3 pelas células Treg. Neste caso observou-se uma diminuição da expressão nas células estimuladas em relação às não estimuladas, em todos os grupos. Após co-cultura com MSCs verificou-se um aumento da expressão de Foxp3 no grupo controlo e uma diminuição no grupo de AR.

O fator de transcrição Foxp3 é expresso pelas células Treg e é necessário para manter a atividade supressora das mesmas. (17) Nos doentes com AR a função destas células parece ser diminuída, daí ocorrer uma diminuição de Foxp3 pelas células estimuladas, nos doentes comparativamente aos indivíduos saudáveis. (30) Ao contrário do que está descrito na literatura, as MSCs não potenciaram o aumento da expressão de Foxp3. (18, 43)

» Conclusão

Este estudo mostrou que as MSCs inibiram a produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-2, IFN- γ , TNF- α , pelas células T CD4⁺ e CD8⁺, em todos os compartimentos funcionais, apesar de apresentarem padrões inibitórios distintos para os diferentes compartimentos.

As MSCs inibiram também a percentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IL-17 e IL-9.

De uma forma geral os doentes com AR comparativamente aos indivíduos saudáveis, são os que apresentaram maior frequência e células T produtoras das citocinas pró-inflamatórias, e estes parecem ser os mais sensíveis ao efeito imunomodulador das MSCs.

Relativamente às citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, TGF- β e IL-4, as MSCs apresentaram a capacidade de potenciar a expressão destas citocinas pelas células em estudo. Também a expressão do marcador de ativação, CTLA-4, que promove a capacidade de supressão das células Treg, foi aumentada depois da co-cultura com MSCs. Por outro lado, as MSCs não apresentaram a capacidade de aumentar a expressão do fator de transcrição Foxp3 nos doentes com AR.

Desta forma, pode-se concluir que as MSCs constituem uma possível abordagem terapêutica para doenças autoimunes, embora estas patologias sejam bastante heterogêneas no que diz respeito aos subtipos de células T e compartimentos presentes. Assim, este estudo permite um conhecimento detalhado sobre o efeito das MSCs em cada compartimento funcional e nas células T CD4⁺ e CD8⁺, para uma melhor utilização destas como terapia celular.

A influência da MSC na IL-9 pode também abrir novas possibilidades de pesquisa sobre o uso clínico destas células na inflamação alérgica.

» Referências Bibliográficas

1. Fernando A. Arosa EMC, Francisco C. Pacheco. Fundamentos de Imunologia. In: Lda L-ET, editor. 2005.
2. Care GifQaEiH. How does the immune system work? USA: Pubmed Health; 2010 [updated Julho 2014]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0010386/>.
3. Fauci AS, Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Martin, J. B., Kasper, D. L., Hauser, S. L.; Longo, D. L. Introduction to the immune system. . In: Editors, editor. Harrison's Principles of Internal Medicine. New York: B. F. Haynes, A. S. Fauci; 2005. p. 1907-30.
4. Sompayrac L. How the Immune System Works. 4 ed. USA: John Wiley & Sons; 2012.
5. Albert BJ, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. . Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science; 2002.
6. Balanescu A, Radu E, Nat R, Regalia T, Bojinca V, Predescu V, et al. Co-stimulatory and adhesion molecules of dendritic cells in rheumatoid arthritis. Journal of cellular and molecular medicine. 2002 Jul-Sep;6(3):415-25. PubMed PMID: 12417058. Epub 2002/11/06. eng.
7. Cruvinal WDM, Mesquita Jr. D., Araújo, J. A. P., Salmazi, K. C., Kállas, E. G., Andrade, L. E. C. Células T regulatórias naturais (TREGS) em doenças reumáticas. Revista Brasileira de Reumatologia. 2008;48:342-55.
8. Antônio Teva JCCF, Vadimir Laurentino Silva. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde.
9. Yeo L. Characterisation of cytokine expression in early synovitis and established rheumatoid arthritis: The University of Birmingham; 2011.
10. Mayer G. Microbiologia e Imunologia On-line Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Sul 2009 [updated Junho 2014]. Available from: <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port.htm>.
11. Danilo Mesquita Júnior JAPA, Tânia Tiekao Takao Catelan, Alexandre Wagner Silva de Souza, Wilson de Melo Cruvinel, Luís Eduardo Coelho Andrade, Neusa Pereira da Silva. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Revista Brasileira de Reumatologia. 2010;50(5):552-80.
12. Hernandez JB, Newton RH, Walsh CM. Life and death in the thymus--cell death signaling during T cell development. Current opinion in cell biology. 2010 Dec;22(6):865-71. PubMed PMID: 20810263. Pubmed Central PMCID: PMC2993787. Epub 2010/09/03. eng.
13. Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. Arthritis research & therapy. 2005;7 Suppl 2:S4-14. PubMed PMID: 15833146. Pubmed Central PMCID: PMC2833981. Epub 2005/04/19. eng.
14. Delves JP, Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M. Fundamentos de Imunologia. 10ª ed 2004.
15. Henriques A, Gomes V, Duarte C, Pedreiro S, Carvalheiro T, Areias M, et al. Distribution and functional plasticity of peripheral blood Th(c)17 and Th(c)1 in rheumatoid arthritis. Rheumatology international. 2013 Aug;33(8):2093-9. PubMed PMID: 23412693. Epub 2013/02/16. eng.
16. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J, Kaneko K, Watanabe K, et al. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. Clinical & developmental immunology. 2013;2013:968549. PubMed PMID: 23956763. Pubmed Central PMCID: PMC3728507. Epub 2013/08/21. eng.
17. Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. Journal of molecular cell biology. 2009 Oct;1(1):20-36. PubMed PMID: 19482777. Pubmed Central PMCID: PMC2841031. Epub 2009/06/02. eng.
18. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. Stem cell research & therapy. 2011;2(4):34. PubMed PMID: 21861858. Pubmed Central PMCID: PMC3219065. Epub 2011/08/25. eng.

19. Gol-Ara M, Jadidi-Niaragh F, Sadria R, Azizi G, Mirshafiey A. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:805875. PubMed PMID: 23133752. Pubmed Central PMCID: PMC3486158. Epub 2012/11/08. eng.
20. Serrano Hernandez A. [Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis]. *Reumatologia clinica*. 2009 Apr;5 Suppl 1:1-5. PubMed PMID: 21794634. Epub 2009/04/01. Celulas colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. spa.
21. Chen J, Li J, Gao H, Wang C, Luo J, Lv Z, et al. Comprehensive evaluation of different T-helper cell subsets differentiation and function in rheumatoid arthritis. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:535361. PubMed PMID: 23091349. Pubmed Central PMCID: PMC3469210. Epub 2012/10/24. eng.
22. Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004 Mar;36(3):372-8. PubMed PMID: 14687914. Epub 2003/12/23. eng.
23. Pawlowska J, Smolenska Z, Witkowski J, Bryl EM. Different pattern of T-cell subpopulations in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis at various stages of disease development. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*. 2014;124(1-2):43-50. PubMed PMID: 24504139. Epub 2014/02/08. eng.
24. Silva RG, Vannucci AB, Latorre LC, Zerbini CAF. Artrite Reumatóide. *Revista Brasileira de Medicina*. 2003.
25. American College of Rheumatology [Maio 2014]. Available from: <http://www.rheumatology.org>.
26. Bruce B, Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation. *The Journal of rheumatology*. 2003 Jan;30(1):167-78. PubMed PMID: 12508408. Epub 2003/01/01. eng.
27. Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2014 Feb-Mar;48-49:26-30. PubMed PMID: 24568777. Epub 2014/02/27. eng.
28. Schur PH, F. GS. UpToDate: Wolters Kluwer; [updated Junho 2014]. Available from: <http://www.uptodate.com>.
29. Temprano KK. Rheumatoid Arthritis: Medscape; [Junho 2014]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/331715-overview#a0156>.
30. Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saldenbergh-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *Journal of autoimmunity*. 2012 Sep;39(3):222-8. PubMed PMID: 22704962. Epub 2012/06/19. eng.
31. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2009;373(9664):659-72.
32. Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*. 2005 Jun;11(3 Suppl):S39-44. PubMed PMID: 16357749. Epub 2005/12/17. eng.
33. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2012 Jul;51 Suppl 5:v3-11. PubMed PMID: 22718924. Epub 2012/06/29. eng.
34. Dimitroulas T, Nikas SN, Trontzas P, Kitis GD. Biologic therapies and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2013 Aug;12(10):958-66. PubMed PMID: 23542506. Epub 2013/04/02. eng.
35. Lindstrom TM, Robinson WH. Rheumatoid arthritis: a role for immunosenescence? *Journal of the American Geriatrics Society*. 2010 Aug;58(8):1565-75. PubMed PMID: 20942872. Pubmed Central PMCID: PMC3055796. Epub 2010/10/15. eng.
36. Kim J, Kang S, Kim J, Kwon G, Koo S. Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of laboratory medicine*. 2013

- Jan;33(1):52-9. PubMed PMID: 23301223. Pubmed Central PMCID: PMC3535197. Epub 2013/01/10. eng.
37. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Annual review of pathology. 2009;4:417-34. PubMed PMID: 18954286. Epub 2008/10/29. eng.
38. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. Blood. 2006 Jul 1;108(1):253-61. PubMed PMID: 16537805. Pubmed Central PMCID: PMC1895836. Epub 2006/03/16. eng.
39. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008 Dec 9;105(49):19396-401. PubMed PMID: 19036923. Pubmed Central PMCID: PMC2614772. Epub 2008/11/28. eng.
40. Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. Stem cells international. 2013;2013:732742. PubMed PMID: 24000286. Pubmed Central PMCID: PMC3755386. Epub 2013/09/04. eng.
41. Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. Cloning and stem cells. 2004;6(4):369-74. PubMed PMID: 15671665. Epub 2005/01/27. eng.
42. Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. Stem cells international. 2012;2012:342968. PubMed PMID: 22754575. Pubmed Central PMCID: PMC3382267. Epub 2012/07/04. eng.
43. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. Archives of pharmacal research. 2012 Feb;35(2):213-21. PubMed PMID: 22370776. Epub 2012/03/01. eng.
44. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. Stem cell research & therapy. 2013;4(5):125. PubMed PMID: 24406104. Pubmed Central PMCID: PMC3854702. Epub 2014/01/11. eng.
45. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nature reviews Immunology. 2008 Sep;8(9):726-36. PubMed PMID: 19172693. Epub 2009/01/28. eng.
46. Wang Q, Li X, Luo J, Zhang L, Ma L, Lv Z, et al. The allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cells regulate the function of T helper 17 cells from patients with rheumatoid arthritis in an in vitro co-culture system. BMC musculoskeletal disorders. 2012;13:249. PubMed PMID: 23237239. Pubmed Central PMCID: PMC3551778. Epub 2012/12/15. eng.
47. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine & growth factor reviews. 2009 Oct-Dec;20(5-6):419-27. PubMed PMID: 19926330. Epub 2009/11/21. eng.
48. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. Cytotherapy. 2009;11(4):377-91. PubMed PMID: 19568970. Epub 2009/07/02. eng.
49. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. Journal of biomedical science. 2005;12(1):47-57. PubMed PMID: 15864738. Epub 2005/05/03. eng.
50. Bragança J, Tavares Á, Belo JA. Células estaminais e medicina regenerativa. CanalBQ. 2010.

51. van Laar JM, Tyndall A. Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2006 Oct;45(10):1187-93. PubMed PMID: 16777856. Epub 2006/06/17. eng.
52. Randolph DA, Fathman CG. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annual review of medicine*. 2006;57:381-402. PubMed PMID: 16409156. Epub 2006/01/18. eng.
53. El-Jawhari JJ, El-Sherbiny YM, Jones EA, McGonagle D. Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2014 Jul;107(7):505-14. PubMed PMID: 24518000. Pubmed Central PMCID: PMC4071294. Epub 2014/02/13. eng.
54. Liu Y, Wu J, Zhu Y, Han J. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. *Clinical and experimental medicine*. 2014 Feb;14(1):13-24. PubMed PMID: 23124706. Epub 2012/11/06. eng.
55. Palmer G, Mezin F, Juge-Aubry CE, Plater-Zyberk C, Gabay C, Guerne PA. Interferon beta stimulates interleukin 1 receptor antagonist production in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004 Jan;63(1):43-9. PubMed PMID: 14672890. Pubmed Central PMCID: PMC1754734. Epub 2003/12/16. eng.
56. Aravena O, Pesce B, Soto L, Orrego N, Sabugo F, Wurmman P, et al. Anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis decreases Th1 and Th17 cell populations and expands IFN-gamma-producing NK cell and regulatory T cell subsets. *Immunobiology*. 2011 Dec;216(12):1256-63. PubMed PMID: 21840621. Epub 2011/08/16. eng.
57. Walz A, Andratschke M, Wollenberg B, Lindhofer H, Zeidler R. Prednisolone reduces TNF-alpha release by PBMCs activated with a trifunctional bispecific antibody but not their anti-tumor activity. *Anticancer research*. 2005 Nov-Dec;25(6B):4239-43. PubMed PMID: 16309222. Epub 2005/11/29. eng.
58. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1327-33. PubMed PMID: 17951526. Epub 2007/10/24. eng.
59. Zheng ZH, Li XY, Ding J, Jia JF, Zhu P. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008 Jan;47(1):22-30. PubMed PMID: 18077486. Epub 2007/12/14. eng.
60. Cope AP. T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2008;10 Suppl 1:S1. PubMed PMID: 19007421. Pubmed Central PMCID: PMC2582813. Epub 2008/11/26. eng.
61. Ferraccioli G, Zizzo G. The potential role of Th17 in mediating the transition from acute to chronic autoimmune inflammation: rheumatoid arthritis as a model. *Discovery medicine*. 2011 May;11(60):413-24. PubMed PMID: 21616040. Epub 2011/05/28. eng.
62. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta*. 2011 May;1813(5):878-88. PubMed PMID: 21296109. Epub 2011/02/08. eng.
63. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014 Nov;70(1):11-20. PubMed PMID: 24986424. Epub 2014/07/06. Eng.
64. Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011 Mar 15;186(6):3283-8. PubMed PMID: 21368237. Pubmed Central PMCID: PMC3074408. Epub 2011/03/04. eng.
65. Leng RX, Pan HF, Ye DQ, Xu Y. Potential roles of IL-9 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *American journal of clinical and experimental immunology*. 2012;1(1):28-32. PubMed PMID: 23885312. Pubmed Central PMCID: PMC3714186. Epub 2012/01/01. eng.

66. Noelle RJ, Nowak EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nature reviews Immunology*. 2010 Oct;10(10):683-7. PubMed PMID: 20847745. Pubmed Central PMCID: PMC3828627. Epub 2010/09/18. eng.
67. Luz-Crawford P, Noel D, Fernandez X, Khoury M, Figueroa F, Carrion F, et al. Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PloS one*. 2012;7(9):e45272. PubMed PMID: 23028899. Pubmed Central PMCID: PMC3444478. Epub 2012/10/03. eng.
68. Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, et al. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *European journal of immunology*. 2011 Oct;41(10):2840-51. PubMed PMID: 21710489. Epub 2011/06/29. eng.
69. Qu X, Liu X, Cheng K, Yang R, Zhao RC. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Experimental hematology*. 2012 Sep;40(9):761-70. PubMed PMID: 22634392. Epub 2012/05/29. eng.
70. Guo Z, Zheng C, Chen Z, Gu D, Du W, Ge J, et al. Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells. *European journal of immunology*. 2009 Oct;39(10):2840-9. PubMed PMID: 19637224. Epub 2009/07/29. eng.
71. Carrion F, Nova E, Luz P, Apablaza F, Figueroa F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation. *Immunology letters*. 2011 Mar 30;135(1-2):10-6. PubMed PMID: 20888363. Epub 2010/10/05. eng.
72. Hsu SC, Wang LT, Yao CL, Lai HY, Chan KY, Liu BS, et al. Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4+ CD45RO+ T cells. *Immunobiology*. 2013 Jan;218(1):90-5. PubMed PMID: 22464815. Epub 2012/04/03. eng.
73. Kavanagh H, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy*. 2011 Apr;66(4):523-31. PubMed PMID: 21091718. Epub 2010/11/26. eng.
74. Nemeth K, Keane-Myers A, Brown JM, Metcalfe DD, Gorham JD, Bundoc VG, et al. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Mar 23;107(12):5652-7. PubMed PMID: 20231466. Pubmed Central PMCID: PMC2851758. Epub 2010/03/17. eng.
75. Trandem K, Zhao J, Fleming E, Perlman S. Highly activated cytotoxic CD8 T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011 Mar 15;186(6):3642-52. PubMed PMID: 21317392. Pubmed Central PMCID: PMC3063297. Epub 2011/02/15. eng.
76. Alanara T, Karstila K, Moilanen T, Silvennoinen O, Isomaki P. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2010 Mar;39(2):118-26. PubMed PMID: 20001767. Epub 2009/12/17. eng.
77. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22. PubMed PMID: 15494428. Epub 2004/10/21. eng.
78. McCoy KD, Le Gros G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and cell biology*. 1999 Feb;77(1):1-10. PubMed PMID: 10101680. Epub 1999/04/02. eng.
79. Baek HJ, Zhang L, Jarvis LB, Gaston JS. Increased IL-4+ CD8+ T cells in peripheral blood and autoreactive CD8+ T cell lines of patients with inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008 Jun;47(6):795-803. PubMed PMID: 18390584. Epub 2008/04/09. eng.

