

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**SÍLVIO MANFREDO VIEIRA**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA  
ARTRITE: PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO  
NOD2/RIPK2/CASPASE-1**

**RIBEIRÃO PRETO  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**SÍLVIO MANFREDO VIEIRA**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA  
ARTRITE: PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO  
NOD2/RIPK2/CASPASE-1**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo como  
requisito para obtenção do título de  
Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Farmacologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando de  
Queiróz Cunha**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2009**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Vieira, Sílvio Manfredo.

Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da artrite: participação da via de sinalização NOD2/RIPK2/caspase-1. Sílvio Manfredo Vieira; orientador Fernando de Queiróz Cunha - Ribeirão Preto, 2009. 189 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Palavras-chave: Inflamação imune, NOD2, RIPK2, caspase-1, T<sub>H</sub>17, artrite.



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Sílvio Manfredo Vieira

Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da artrite: participação da via de sinalização NOD2/RIPK2/caspase-1

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Aprovada em:

### **Banca examinadora:**

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade

Instituição: UNIFESP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Instituição: ICB – UFMG

Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com o suporte financeiro das seguintes instituições:



***Dedicatória***

Aos meus pais, Sílvia e Walmira, pelo  
amor incondicional, incentivo e  
presença, mesmo à distância.

Ao meu irmão, Sérgio e a Bina, pela  
amizade, alegria, apoio e serenidade.

A minha sobrinha, linda!

Vocês sabem o quão são importantes para  
mim. Meu sentimento vai além das  
palavras.

# ***Agradecimientos***

## Agradeco

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha, pela confiança em meu trabalho e oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Muito obrigado.

Ao grande mestre, Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, pela confiança em meu trabalho, oportunidade de trabalhar em seu laboratório e principalmente sua amizade.

Aos Profs. Dr. Paulo Louzada Júnior e Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora, pela atenção, e principalmente pela maneira tão gentil em que me atenderam.

Ao Prof. Dr. Dario Simões Zamboni, pelo apoio e discussões científicas, além da disponibilidade de participar da minha banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Mauro Teixeira pela ajuda científica muito importante na minha formação e pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora.

Ao meu amigo Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, pelo companheirismo e amizade sincera. O destino foi muito bom ao promover nosso encontro: leal e verdadeiro.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva que abriu seu laboratório para a realização dos experimentos de real-time RT-PCR e a sua técnica Cristiane Maria Milanezi, que prontamente ajudou a desenhar os primers para os experimentos.

Ao Dr. Sérgio Couto Luna Almeida, pela gentileza em auxiliar na organização e coleta das amostras dos pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite.

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, pelas orientações nas análises estatísticas deste trabalho e também pela amizade.

A minha querida amiga, Larissa, não só por sua ajuda imprescindível neste trabalho, mas também pela amizade tão sincera. Obrigado chaveirinho!

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Waldiceu Ap. Verri Júnior, pela confiança e amizade.

Ao meu amigo Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga, sem dúvida uma colaboração que perdurará por muitos anos. Obrigado pelo apoio científico e amizade.

Ao meu amigo Sergio Roberto Rosa, vulgo “Serginho” por sua ajuda durante estes 5 anos. Muito obrigado!

À Fabíola Leslie Mestriner, pela ajuda incondicional e amizade. Muito obrigado fofutcha.

Ao meu grande amigo Fernando Spiller, pelo papo cabeça nas horas difíceis, companheirismo e amizade sincera.

Aos meus amigos, Jhimmy Talbot, Johnny Berlink e Fabrício Oliveira Souto, pela participação nos trabalhos, porém mais ainda pela amizade e companheirismo que constituímos.

Ao meu amigo Guilherme “Tião”. Valeu compadre!!

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, muito obrigado por esses anos de convivência, seu bom humor é contagiante.

Ao amigo Henrique de Paula Lemos, muito obrigado por sua ajuda e discussão na parte inicial deste trabalho.

As minhas queridas amigas, Ana Tereza Guerrero, Andressa de Freitas, Dani Secco e Tânia Santodomingo Garzon pela amizade sincera e pelo apoio em todos os momentos. Agradeço por conviver com pessoas tão sensatas e integras como vocês.

À minha querida amiga Giuliana Bertozzi Francisco, muito obrigado por sua ajuda em vários experimentos e principalmente por seu enorme carinho. Valeu Giuzinha!!

À Ieda Regina dos Santos Schivo, por sua ajuda e profissionalismo.

À Ana Kátia dos Santos (Katinha), pela ajuda profissional, mas principalmente pelo carinho e amizade durante estes anos.

À Diva Amábil de Sousa pela convivência, pelo carinho e amizade.

À Dra. Eleni Tamburus e Tadeu Vieira pela ajuda nos experimentos de histologia e pelo carinho.

À Vani Correa, pelas discussões e dicas em relação aos experimentos de imunofluorescência e também pelo carinho e amizade.

Aos amigos do laboratório de Inflamação e Dor: Adriana Souza, Dani Carlos, Dani Nascimento, Danilo Magro, Daniel Jaú, Eleonora, Fabiane Soneto, Francine, Ibrahim, Jozi Godoy, Luiz Fernando, Mari, Maria Orrico, Paulo Barboni, Paula Barbim, Paula Czaikoski, Rafael Poloni, Rafaela Bittencourt, Renata Grespan, Silvia Trevelin, Thiago Garlet e Vanessa Carregaro. Obrigado por transformar nosso laboratório em um lugar maravilhoso pra se trabalhar.

Aos amigos Valéria Cristina Squissato e Acácio Antunes Cardoso pela ajuda nesta fase de minha vida, dedicação em suas atividades, mas principalmente pela amizade.

Aos amigos do DOL, pelas produtivas discussões, mas também pela amizade.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, em especial àqueles que participaram mais diretamente da minha formação científica: Prof. Dr. Adalberto Rosa, Prof. Dr. Alexandre Conrado, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Maria de Oliveira, Prof. Dr. Antônio Roberto Martins, Prof. Dr. Fernando Morgan, Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, Prof. Dr. Gustavo Ballejo Oliveira, Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr, Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lusiane Maria Bendhack, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Cristina de Oliveira Salgado, Prof. Dr. Norberto Coimbra por todos ensinamentos e convívio durante esta jornada.



Aos amigos do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pelo convívio e amizade. Deixo aqui meu agradecimento especial a todos vocês.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Sônia Maria Stefanelli, Fátima Helena Petean e José Waldik Ramon pela dedicação, amizade e competência nas resoluções administrativas. Obrigado pelo nosso maravilhoso convívio.

Aos bioteristas: Julio Siqueira, Maria Inês Castrechini Nemoto e Eliana Beatriz Castrechini de Barros, pelo cuidado com os animais do biotério, tão importantes para nosso trabalho, e principalmente pelo carinho comigo.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pela competência e dedicação e também pelo convívio.

À FAPEAM pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram por minha vida durante este período.

***Resumo***

## RESUMO

Vieira, S. M. **Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da artrite: participação da via de sinalização NOD2/RIPK2/Caspase-1.** 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

NOD2 (domínio de oligomerização vinculado ao nucleotídeo, membro 2) é uma proteína, também conhecida como família de domínio de recrutamento de caspase, membro 15 (CARD15), que desempenha um papel importante no sistema imunológico. O NOD2 pode contribuir para a iniciação, amplificação e progressão da resposta inflamatória em doenças reumáticas através do reconhecimento de agentes patogênicos, produtos de células danificadas ou metabolitos endógenos encontrados nas articulações artríticas. Neste estudo nós demonstramos que o NOD2, o RIPK2 e a caspase-1, mas não NOD1, estão envolvidos na patogênese da artrite auto-imune e colaboram na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Nós investigamos a participação do NOD1, NOD2, RIPK2 e caspase-1 na progressão da artrite induzida em camundongos. O desenvolvimento da artrite nos camundongos foi dependente da ativação do NOD2, RIPK2 e caspase-1 pelo antígeno, pois os camundongos deficientes para estas moléculas não desenvolveram a artrite. A avaliação clínica e histopatológica dos camundongos *NOD2<sup>-/-</sup>*, *RIPK2<sup>-/-</sup>* e *caspase-1<sup>-/-</sup>* mostrou que estes animais eram resistentes ao desenvolvimento da artrite, caracterizada por uma redução no recrutamento de neutrófilos, na hipernocicepção e na perda de cartilagem. Nossos resultados mostram que a expressão do mRNA de NOD2, RIPK2 e IL-1 $\beta$  e a ativação de caspase-1 estão elevados em células mononucleares de pacientes com artrite reumatóide (AR) em comparação a pacientes com osteoartrite (OA). Estes resultados sugerem fortemente que a sinalização via NOD2, mas não NOD1, desempenha um papel fundamental na patogênese da AR. Além disso, RIPK2/caspase-1 parece ser a jusante de sinalização de NOD2 na inflamação das articulações e pode favorecer uma resposta imune T<sub>H</sub>17. Os resultados levam a propor a sinalização do NOD2 como um novo alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos para controlar a AR.

Palavras-chave: Inflamação imune, NOD2, RIPK2, caspase-1, T<sub>H</sub>17, artrite.

# ***Abstract***

## ABSTRACT

Vieira, S. M. **Mechanisms involved in the development of arthritis: involvement of the signaling pathway NOD2/RIPK2/Caspase-1.** 2009. Thesis (Doctoral) – School of Medicine of Ribeirão Preto. University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) is a protein, also known as the caspase recruitment domain family, member 15 (CARD15), which plays an important role in the immune system. NOD2 may contribute to the initiation, amplification and progression of the inflammatory response in rheumatic diseases through sense pathogens, products of damaged cells or endogenous metabolites found in arthritic joints. Here, we show that NOD2, RIPK2 and caspase-1, but not NOD1, are involved in the pathogenesis of autoimmune arthritis and collaborate in the regulation of cytokines. We investigated the involvement of NOD1, NOD2, RIPK2 and caspase-1 in the progression of arthritis induced in mice. The onset of arthritis was dependent on NOD2, RIPK2 and caspase-1 activation by antigen, as knockout mice for these molecules did not develop arthritis. Clinical and histopathological evaluation of *NOD2*<sup>-/-</sup>, *RIPK2*<sup>-/-</sup> and *caspase-1*<sup>-/-</sup> mice were protected against arthritis, characterized by reduced neutrophil recruitment, hypernociception and cartilage loss. Our data shows that NOD2, RIPK2 and IL-1 $\beta$  mRNA expression and caspase-1 activation from mononuclear cells of rheumatoid arthritis (RA) patients are elevated in comparison with osteoarthritis (OA). These results strongly suggest that NOD2 signaling, but not NOD1, plays a fundamental role in the pathogenesis of RA. Furthermore, RIPK2/caspase-1 pathway seems to be the downstream signaling of NOD2 in joint inflammation and might favor T<sub>H</sub>17 immune response. Together, it is reasonable to propose NOD2 signaling as a novel target to development of new drug to control RA.

Keywords: Immune inflammation, NOD2, RIPK2, Caspase-1, T<sub>H</sub>17, arthritis.

## ***Abreviaturas***

## **ABREVIATURAS**

**(-/-): deficientes homozigotos**

**µg: micrograma –  $10^{-6}$  do grama**

**µL: microlitros –  $10^{-6}$  do litro**

**AINES: antiinflamatórios não-esteroidais**

**AKT: proteína quinase B**

**AMPC: adenosina monofosfato cíclico**

**ANOVA: análise de variância**

**ATP: adenosina trifosfato**

**°C: graus Celsius**

**C5a: quinto fragmento do sistema complemento ativado**

**CCL: quimiocina CC ligante**

**CXCL: quimiocina CXC ligante**

**CFA: adjuvante completo de Freund**

**CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina**

**cm: centímetros**

**COX: enzima cicloxygenase**

**DMSO: dimetil sulfoxido**

**EDTA: ácido etilenodiaminotetracético**

**ELISA: ensaio imunoenzimático ligado a enzima**

**ELR: glutamato-leucina-arginina**

**ENA-78: peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais**

**E.P.M.: erro padrão da média**

**FLAP: proteína ativadora da 5-lipoxigenase**

**g: gramas**

**GMPC:** guanosina monofosfato cíclico

**GCP-2:** proteína quimiotática para granulócitos

**GRO:** oncogene regulador do crescimento

**h:** hora

**hs:** horas

**IASP:** Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*)

**i.a.:** intra-articular

**i.p.:** intraperitoneal

**ICAM:** molécula de adesão intercelular

**IFN:** interferon

**IL:** interleucina

**IL-1ra:** antagonista do receptor de IL-1

**IM:** imunizado

**KC:** quimiocina derivada de queratinócitos

**kg:** quilograma (s)

**L:** litro (s)

**LFA-1:** função antigênica-1 associado ao linfócito

**LIX:** quimiocina CXC induzida por lipopolissacarídeo

**LPS:** lipopolissacarídeo

**LT:** leucotrieno

**LTB<sub>4</sub>:** leucotrieno B<sub>4</sub>

**mg:** miligrama

**mL:** mililitro

**mm<sup>2</sup> :** milímetros quadrados



**mmHg: milímetros de mercúrio**

**mBSA: albumina bovina sérica metilada**

**MCP-4: proteína quimiotática para monócitos**

**min: minuto (s)**

**MIP: proteína inflamatória de macrófagos**

**MPO: mieloperoxidase**

**N: número**

**ng: nanogramas**

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato de sódio**

**NaOH: hidróxido de sódio**

**NAP-2: peptídeo-2 ativador de neutrófilos**

**NF: fator de necrose tumoral**

**NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B**

**NI: não-imunizado**

**NK: matadora natural**

**NLR: receptor tipo NOD**

**NO: óxido nítrico**

**NOD: domínio de oligomerização de nucleotídeo**

**PAF: fator de agregação plaquetária**

**PBS: tampão salina fosfato**

**PECAM: molécula de adesão célula endotelial-plaqueta**

**pg: picograma (s)**

**PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>**

**RANTES: citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais**

**s.c.: subcutânea**

**TCR: receptor de células T**

**Th: T auxiliar**

**TLR: receptor tipo Toll**

**TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral**

**v.o.: via oral**

**VCAM: molécula de adesão vascular**

**5-LO: enzima 5-lipoxigenase**

# ***Sumário***

## SUMÁRIO

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                     | <b>24</b> |
| 1.1 – Artrite Reumatóide                                                                 | 25        |
| 1.1.1 – Patogênese da AR                                                                 | 28        |
| 1.2 – Receptores de Reconhecimento de Patógenos (PRRs)                                   | 32        |
| 1.2.1 – Sinalização via NOD1 e NOD2                                                      | 34        |
| 1.2.2 – NOD1 e NOD2 na imunidade inata e adaptativa                                      | 37        |
| 1.2.3 – O inflamassoma                                                                   | 38        |
| 1.3 – Células T “helper”                                                                 | 39        |
| 1.3.1 – Origem e funções das células T <sub>H</sub> 17                                   | 40        |
| 1.3.1.1 – Subgrupos de células T-helper                                                  | 40        |
| 1.3.1.2 – Diferenciação de células T <sub>H</sub> 17                                     | 41        |
| 1.3.1.3 – Células T <sub>H</sub> 17 humanas                                              | 45        |
| 1.3.2 – Interleucina-17 e células T <sub>H</sub> 17 na doença                            | 46        |
| 1.3.2.2 – O eixo IL-23/T <sub>H</sub> 17 na inflamação crônica e na auto-imunidade       | 46        |
| 1.4 – Neutrófilos                                                                        | 48        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                      | <b>52</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                            | <b>54</b> |
| 3.1 – Animais                                                                            | 55        |
| 3.2 – Avaliação nociceptiva                                                              | 55        |
| 3.2.1 – Medida de hipernocicepção mecânica                                               | 55        |
| 3.3 – Preparo de drogas, soluções e reagentes                                            | 57        |
| 3.4 – Protocolos experimentais                                                           | 62        |
| 3.4.1 – Imunização e desafio com mBSA                                                    | 62        |
| 3.4.2 – Migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida por mBSA              | 63        |
| 3.4.3 – Efeito do tratamento com IL-1ra sobre o recrutamento de neutrófilos e nocicepção | 65        |
| 3.4.4 – Extração de RNA e Real-Time RT-PCR                                               | 65        |
| 3.4.5 – Ensaio de quantificação de proteoglicano                                         | 66        |
| 3.4.6 – Análise histológica                                                              | 68        |
| 3.4.7 – ELISA                                                                            | 69        |
| 3.4.8 – Citometria de fluxo                                                              | 70        |

|                                          |            |
|------------------------------------------|------------|
| 3.4.9 – Ensaio de proliferação celular   | 71         |
| 3.4.10 – Artrite induzida por colágeno   | 71         |
| 3.5 – Análise estatística dos resultados | 72         |
| <b>4. RESULTADOS</b>                     | <b>73</b>  |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>                      | <b>119</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>                     | <b>134</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>     | <b>136</b> |
| <b>8. ANEXOS</b>                         | <b>151</b> |

# ***Introdução***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica e destrutiva das articulações que afeta aproximadamente 0,5 a 1% da população no mundo industrializado e, comumente, leva a uma incapacidade significativa nos movimentos articulares com consequente redução na qualidade de vida (WOLFE; HAWLEY, 1998; GABRIEL, 2001). A AR é de duas a três vezes mais frequente em mulheres do que em homens e pode começar em qualquer idade, com um pico de incidência entre a quarta e a sexta década de vida. A AR está associada a elevados custos de tratamento e, se não tratada adequadamente, com uma redução da expectativa de vida (PINCUS; BROOKS; CALLAHAN, 1994; YELIN; WANKE, 1999; PUGNER *et al.*, 2000). Além do inchaço e dor causada pelo processo inflamatório, o marco final da AR é a destruição articular (cf.: **figura 1**).

A articulação sinovial, no indivíduo sadio, é composta de duas extremidades ósseas adjacentes cobertas com uma camada de cartilagem, separadas por um espaço comum e rodeado pela membrana sinovial e capsula articular. A membrana sinovial é normalmente maior que 100 mm de espessura e o revestimento sinovial (de frente para a cartilagem e para o osso) é constituído por uma fina camada (1-3 células) de sinoviócitos (“tipo A” são macrófagos derivados e do “tipo B” são fibroblastos derivados). Há somente poucas células mononucleares e, se houver, elas são intercaladas na subcamada de tecido conjuntivo, que tem vascularização considerável. A membrana sinovial cobre todas as estruturas intra-articulares, exceto

a cartilagem, pequenas áreas de osso exposto ("áreas vazias") e inserções próximas a junção da cartilagem óssea (cf.: **figura 1A**).

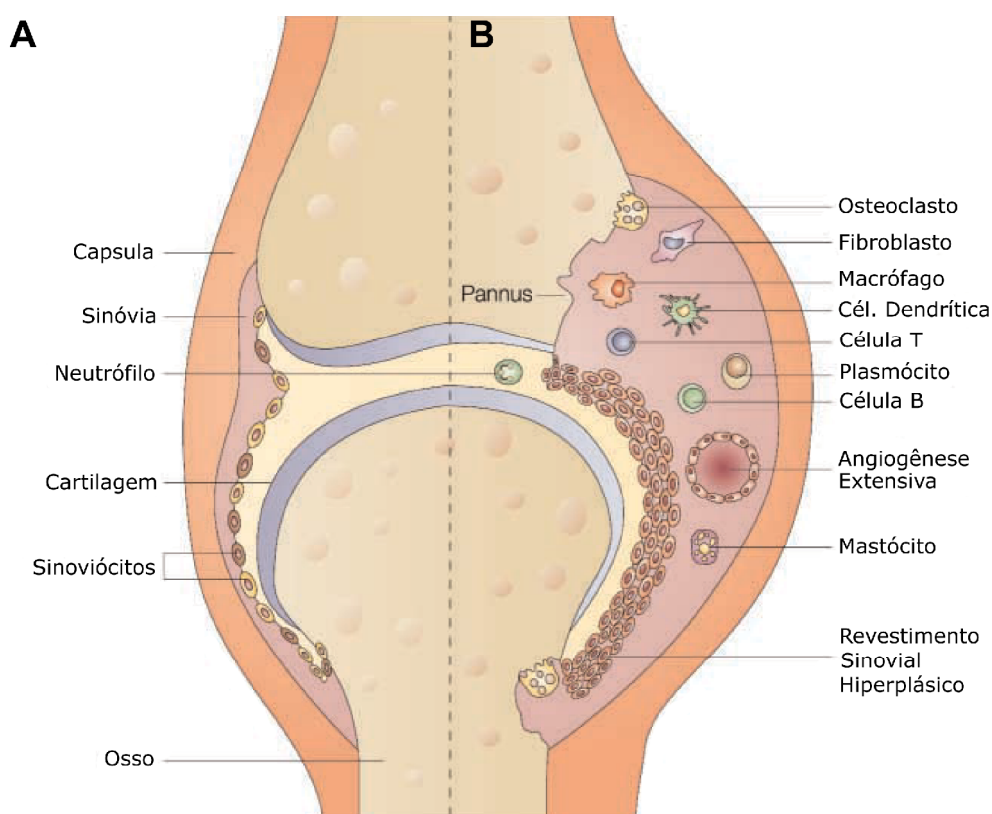
Como muitas outras formas de artrite, a artrite reumatóide é caracterizada inicialmente por uma resposta inflamatória da membrana sinovial (sinovite), que é transmitida por um afluxo transendotelial e/ou locais de ativação de uma variedade de células mononucleares, como células T, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, bem como pela formação de novos vasos. O infiltrado linfóide pode ser difuso ou, comumente, formado por estruturas do tipo folículo-linfóide. A camada de revestimento torna-se hiperplásica (ela pode ter uma espessura de >20 células) e a membrana sinovial se expande formando vilosidades. Além disso, a AR é caracterizada pela destruição do osso. Essa porção destrutiva da membrana sinovial é chamada "pannus" e o elemento destrutivo celular são os osteoclastos – a destruição começa principalmente na junção cartilagem-osso da membrana sinovial. Neutrófilos são encontrados, em número elevado, no líquido sinovial, mas raramente são vistos na membrana sinovial, sugerindo migração muito rápida do sangue para o espaço articular. Da mesma forma as enzimas dos neutrófilos, juntamente com as enzimas secretadas por sinoviócitos e condrócitos, levam à degradação da cartilagem (cf.: **figura 1B**).

A AR é uma poliartrite, ou seja, envolve muitas articulações (seis ou mais), embora nas fases iniciais da doença apenas uma ou poucas articulações possam ser atingidas. Praticamente todas as articulações periféricas podem ser afetadas pela doença, no entanto, as articulações mais comumente envolvidas são as das mãos, pés e joelhos (SMOLEN *et al.*, 1995) e as articulações interfalangeanas distais geralmente são poupadas. Além disso, a AR pode afetar a coluna vertebral e



comprometer a articulação atlanto-axial em pacientes que possuam a enfermidade há muito tempo, constituindo uma causa direta de morte.

A terapia para a AR assenta em duas abordagens principais: tratamento sintomático com antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) e drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs). Os AINEs interferem com apenas um pequeno segmento da cascata inflamatória, designadamente a produção de prostaglandinas por cicloxigenases (COXs), mas não interferem com eventos imuno-inflamatórios subjacentes ou retarda a destruição da articulação. Em contrapartida, os DMARDs 'modificam' o processo da doença em todos seus aspectos e, uma vez eficaz, não há necessidade da utilização de outras terapias. Somando-se a estas terapias, há alguns anos, o mercado farmacêutico vem disponibilizando drogas nomeadas imunobiológicos, os quais auxiliam no tratamento da AR ao agir diretamente sobre as citocinas pró-inflamatórias ou seus receptores.



**Figura 1. Visão esquemática de uma articulação normal e suas alterações na artrite reumatóide. A. A articulação sinovial normal. B. A articulação sinovial de indivíduo com artrite.**

### 1.1.1.1. Patogênese da AR

A causa da AR permanece desconhecida, mas estudos minuciosos sobre as vias patogênicas têm indicado muitos mediadores inflamatórios envolvidos na geração da doença, os quais se tornaram alvos terapêuticos (cf.: **figura 2**). Também há muito se especulou que a AR poderia ser desencadeada por agentes infecciosos (EBRINGER; WILSON, 2000; TOIVANEN, 2001; SILMAN; PEARSON, 2002), entretanto a prova disto ainda é imprecisa. Curiosamente, a esse respeito, pacientes com AR respondem favoravelmente às drogas que possuem atividade antibiótica (JAFFE, 1970; VAN DER HEIJDE *et al.*, 1989; KLOPPENBURG *et al.*, 1994), apesar dos mecanismos de ação antibacterianos não estarem usualmente envolvidos nesse processo inflamatório. Nesse ínterim, várias células, especialmente células dendríticas, expressam moléculas de reconhecimento padrão, tais como os receptores Toll-like (ARMANT; FENTON, 2002; DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002) e NOD-like (INOHARA *et al.*, 2005), os quais se ligam a várias estruturas próprias e estranhas como parte da resposta imune inata, tornando-se posteriormente ativadas e atuando sobre células do sistema imune adaptativo.

Antígenos associados à artrite são provavelmente apresentados às células T pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) especializadas, tais como células dendríticas, macrófagos ou células B. As células T presentes na membrana sinovial usualmente pertencem ao tipo  $T_H1$ . O aumento na ativação das células T está associado com a secreção de várias citocinas, tais como a interleucina (IL) -2 e o interferon- $\gamma$ . Estas células T estimuladas induzem a ativação de macrófagos, células B, fibroblastos e osteoclastos (BOMBARA *et al.*, 1993; KONG *et al.*, 1999). Os linfócitos B expressam várias moléculas de superfície, especialmente receptores de

antígeno, imunoglobulinas e antígenos de diferenciação, tais como CD20 e CD22. Eles se diferenciam em plasmócitos, que secretam anticorpos, incluindo autoanticorpos, por exemplo, o fator reumatóide (IgG), peptídeos citrulinados, fibrinogênio e antígeno de artrite reumatóide de 33kDa (RA33) (STEINER; SMOLEN, 2002). Autoanticorpos podem formar imunocomplexos que aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- $\alpha$  (DEBETS *et al.*, 1988) – a presença de autoanticorpos está associada com a severidade da artrite (NELL *et al.*, 2005; RANTAPAA-DAHLQVIST, 2005). As células B ativadas também podem servir como APCs (RODRIGUEZ-PINTO, 2005) levando a ativação das células T e potencialmente induzindo a um ciclo de perpetuação da resposta autoimune (PANAYI, 2005).

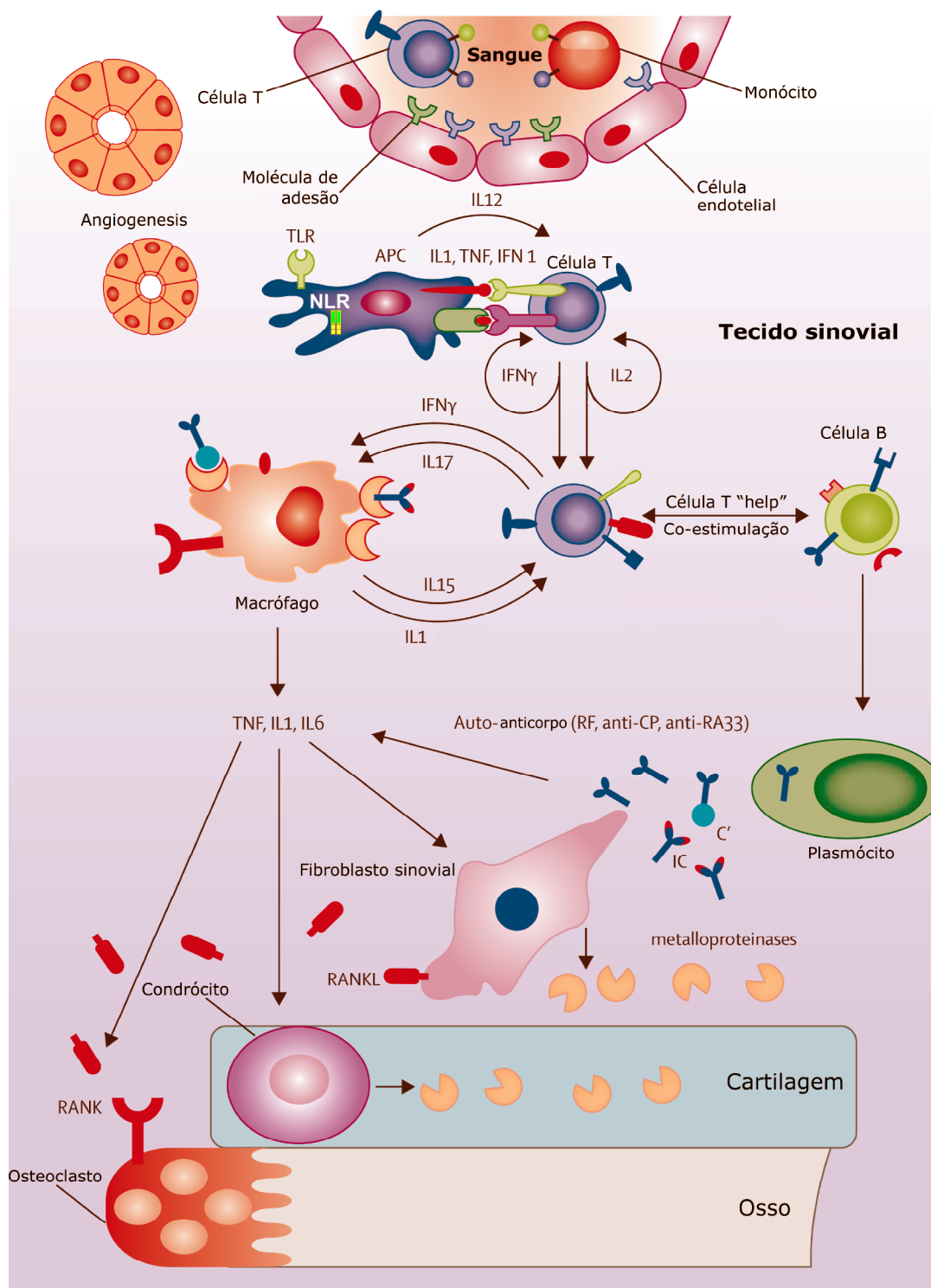
Várias outras populações celulares se acumulam na membrana sinovial de pacientes com AR, via ativação das células endoteliais (cf.: **figura 2**). Além das populações celulares tradicionais do sistema imune inato e adaptativo, a neovascularização toma parte e ocorre um grande aumento na população de sinoviócitos do tipo fibroblastos que estão superativados e produzem citocinas (em parte, de forma autócrina), prostaglandinas e metaloproteinases (FIRESTEIN, 1996).

Muitas citocinas são acionadas na sinóvia por várias populações celulares, muitas delas secretadas por células do tipo macrófagos (FIRESTEIN; ALVARO-GRACIA; MAKI, 1990; CHU *et al.*, 1991; MCINNES *et al.*, 1997; GRACIE *et al.*, 1999; STEINER *et al.*, 1999; FELDMANN *et al.*, 2001; ZWERINA *et al.*, 2005). Elas incluem o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , que constituem o alvo terapêutico de vários fármacos na artrite reumatóide, os quais inibem diretamente esses mediadores inflamatórios ou interferem em suas ligações aos seus respectivos receptores. Outra citocina pró-inflamatória que tem se tornado foco de grande interesse é a IL-6, a qual pode ter

sua produção induzida pelo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (DAYER *et al.*, 1977; MIOSSEC; DINARELLO; ZIFF, 1986; EASTGATE *et al.*, 1988; SAXNE *et al.*, 1988; FIRESTEIN; ALVARO-GRACIA; MAKI, 1990; CHU *et al.*, 1991; OKAMOTO *et al.*, 1997; STEINER *et al.*, 1999). A IL-6 parece apresentar diversas atividades importantes no contexto da artrite reumatóide: ela é capaz de induzir a produção de autoanticorpos pelas células B; ativa células T, macrófagos e osteoclastos; e é a principal ativadora da resposta hepática de fase aguda (MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009).

Dois outros importantes grupos de moléculas são as quimiocinas e as moléculas de adesão, que se ligam a receptores específicos e conduzem funções múltiplas, tais como interações célula-célula (incluindo interações com células endoteliais), migração e quimioatração (SMOLEN; STEINER, 2003; HARINGMAN; OOSTENDORP; TAK, 2005). Estas moléculas, ao se ligarem a seus respectivos receptores, induzem sinais de transdução que levam a ativação de fatores de transcrição e, subsequentemente, responsividade gênica (SMOLEN; STEINER, 2003).

Esses eventos promovem o influxo, a expansão e a ativação de células na sinóvia levando a uma resposta inflamatória e destrutiva na artrite reumatóide, que culmina nos sinais clínicos de inchaço, rigidez e dor, com consequente destruição articular. No entanto, analisando a patogênese da doença, a hierarquia geral dos eventos permanece enigmática e a resposta imune inata, tal como a participação dos receptores NOD-like, pode principiar a cascata dos eventos inflamatórios na AR.



**Figura 2. Representação esquemática dos eventos que ocorrem na artrite reumatóide.** As células T que invadem a membrana sinovial são principalmente  $CD4^+$  de memória. Através do contato célula-célula e através de diferentes citocinas. As células T irão ativar monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais. Os últimos, então, produzem citocinas pró-inflamatórias que parecem constituir o evento central, levando à inflamação crônica. Através de cascatas de transdução de sinal, estas citocinas podem ativar uma variedade de genes característicos da resposta inflamatória, incluindo genes que codificam várias citocinas e MMPs envolvidos na degradação de tecidos.  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$  também induzem a expressão de RANKL nas células do estroma ou células T, que auxiliam na diferenciação de osteoclastos, que destroem o osso. Além disso, os condrócitos também se tornam ativados, levando à liberação de MMPs. Eventos iniciais também podem envolver a ativação de APCs através de receptores NOD-like (NLRs) antes do acoplamento da célula T à APC.

## 1.2. Receptores de Reconhecimento de Patógenos (PRRs)

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo e está envolvido na detecção inicial e remoção de agentes patogênicos. Ao contrário das reações imunológicas induzidas pelo sistema imune adaptativo, a resposta imune inata é ativada dentro de poucos minutos após o encontro com os organismos invasores. A ciência sobre o sistema imunológico inato tem se expandido muito na última década, entretanto, sua relação com os mecanismos de autoimunidade e a resposta imune adaptativa necessita de mais investigações, o que tem sido objeto de calorosas discussões no meio científico. O principal avanço conceitual na imunidade inata foi a descoberta dos receptores de reconhecimento de patógeno (PRRs) que distinguem estruturas microbianas conservadas, comumente referidos: padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Esses PAMPs frequentemente desempenham uma função crucial na vida do micróbio e inclui o lipopolissacarídeo (LPS) – um dos principais componentes da camada externa de bactérias gram-negativas –, o peptidoglicano (PGN) – principal componente da parede celular de bactérias gram-positivas –, a flagelina e os ácidos nucléicos microbianos.

Os PRRs compreendem um conjunto de sensores presentes no plasma, na membrana plasmática e no citosol do hospedeiro. A ativação de múltiplos PRRs em resposta a um patógeno, frequentemente, resulta em um código combinatório que leva especificamente a resposta do hospedeiro a uma determinada classe de micróbios (FRANCHI *et al.*, 2008; SHAW *et al.*, 2008). Há indícios crescentes de que certos PRRs estão envolvidos não somente na detecção de microrganismos, mas também no reconhecimento de sinais endógenos de caráter não-microbiano

(SANSONETTI, 2006). A ativação dos PRRs por estímulos microbianos ou endógenos resulta na ativação de várias vias de sinalização, incluindo o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a reposta de interferon tipo I (IFN), que leva à indução de respostas pró-inflamatórias e antimicrobianas (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

A maioria do conhecimento sobre PRRs deriva de estudos sobre os receptores Toll-like (TLRs), a primeira classe de PRRs a ser identificada. Os TLRs foram descritos pela primeira vez a partir da mosca de fruta e se localizam tanto na superfície celular quanto em endossomas (TAKEDA; AKIRA, 2005; UEMATSU; AKIRA, 2007). Em contrapartida, os receptores NLRs, do tipo domínio de oligomerização de nucleotídeo (NOD), são sensores citosólicos intracelulares. Os NLRs foram identificados primeiramente em plantas, onde desempenham função crítica de resistência a doenças promovidas por micróbios patogênicos e parasitas (CHISHOLM *et al.*, 2006; JONES; DANGL, 2006). Homólogos do NLRs estão presentes em vertebrados e em organismos filogeneticamente mais primitivos, tais como o ouriço-do-mar, cujo genoma contém pelo menos 203 NLRs (HIBINO *et al.*, 2006). A conservação evolutiva dos NLRs sugere que eles desempenham uma função importante na defesa do hospedeiro.

Existem 23 membros da família dos NLRs em seres humanos e pelo menos 34 em camundongos. Os NLRs são expressos em muitos tipos celulares, incluindo células do sistema imune e células epiteliais, embora certos membros da família NLRs sejam expressos principalmente em fagócitos, incluindo macrófagos e neutrófilos. Os NLRs são proteínas compostas por uma região efetora variável N-terminal que pode consistir de um domínio de recrutamento de caspase (CARD), ou um domínio pirina (PYD), ou um domínio de ácido, ou um domínio inibidor de

baculovírus (BIRs), uma região central NOD que é crítica para a ativação e uma região C-terminal rica em repetições de leucina (LRRs) que detecta os PAMPs.

### 1.2.1. Sinalização via NOD1 e NOD2

Os receptores NOD1 e NOD2 foram primeiramente descobertos em mamíferos como membros da família de reguladores de apoptose Ced4/Apaf-1 (INOHARA *et al.*, 1999; OGURA *et al.*, 2001). O NOD1 e o NOD2 (cf.: **figura 3**) são proteínas de domínio múltiplo que consistem em um ou dois domínios CARD: respectivamente, um domínio NOD localizado centralmente, seguido de um número de LRRs C-terminal. O NOD1 e NOD2 são encontrados em vertebrados, mas não estão presentes em insetos ou vermes. O NOD1 é amplamente expresso em muitos tipos de células e órgãos. Porém, a expressão do NOD2 parece ser mais restrita, tendo sido descrita em macrófagos (OGURA *et al.*, 2001), células dendríticas (TADA *et al.*, 2005), células de Paneth (OGURA *et al.*, 2003), queratinócitos (VOSS *et al.*, 2006), células epiteliais do intestino (HISAMATSU *et al.*, 2003) e pulmão (UEHARA *et al.*, 2007), e cavidade oral (UEHARA *et al.*, 2005). Ambos NOD1 e NOD2 são expressos no citoplasma, mas recentemente foi demonstrado que uma fração do NOD1 (KUFER *et al.*, 2008) e do NOD2 (BARNICH *et al.*, 2005) pode estar associada à membrana plasmática.

Os receptores NOD1 e NOD2 parecem estar mantidos num estado inativado por interações intramoleculares. Evidências experimentais que suportam esta hipótese incluem a observação de que um truncamento ou uma mutação na região LRRs C-terminal de uma variedade de NLRs tipicamente resulta numa forma constitutivamente ativa do receptor (TANABE *et al.*, 2004). No caso do NOD2, a



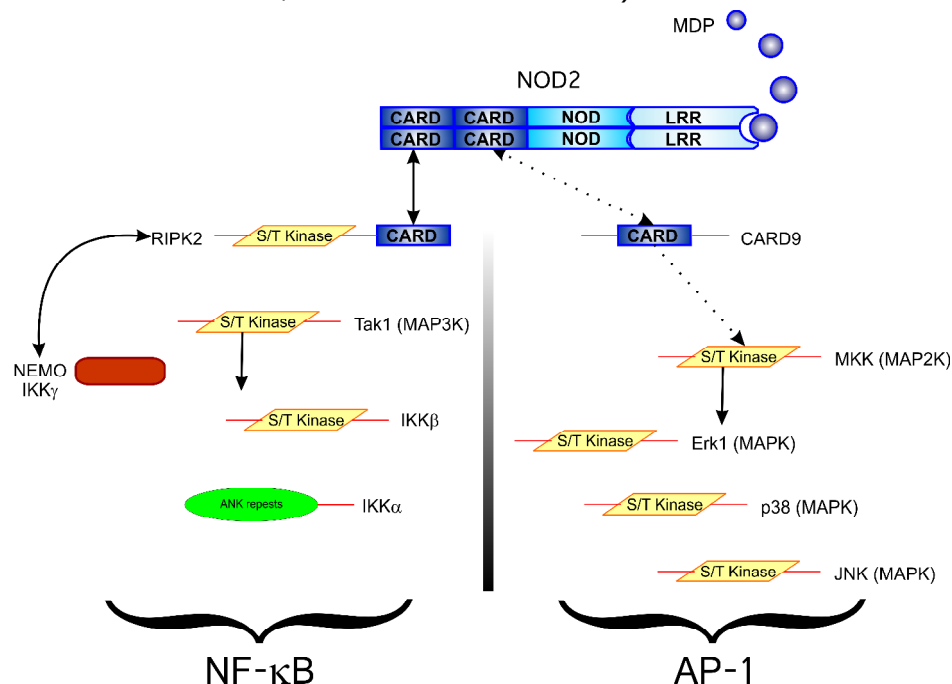
região C-terminal, constituída pela LRRs, pode interagir com um fragmento N-terminal constituído de domínios CARD e NOD, e estas interações são interrompidas quando ocorre a presença do ligante de NOD2 (HSU *et al.*, 2008).

A estimulação do NOD1 ou NOD2 resulta na ativação do NF- $\kappa$ B e MAPKs, que leva a transcrição de numerosos genes envolvidos na imunidade inata e adaptativa (HAYDEN; GHOSH, 2004) (cf.: **figura 3**). Ambos NOD1 e NOD2 detectam moléculas bacterianas produzidas durante a síntese, degradação e remodelação do PGN, o principal componente da parede celular bacteriana (MCDONALD; INOHARA; NUNEZ, 2005). O NOD2 detecta o muramyl dipeptídeo (MDP) que é encontrado no PGN de quase todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MCDONALD; INOHARA; NUNEZ, 2005), enquanto o NOD1 reconhece o ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP) contido nos fragmentos de PGN (CHAMAILLARD *et al.*, 2003; GIRARDIN *et al.*, 2003a). Células ou camundongos deficientes de NOD1 e NOD2 não apresentam ativação de NF- $\kappa$ B e MAPKs, bem como produção de citocinas e quimiocinas em resposta à estimulação com seus ligantes específicos (KOBAYASHI *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2007a; PARK *et al.*, 2007b; KIM *et al.*, 2008a; KIM *et al.*, 2008b).

Dando sequência a detecção microbiana, o NOD1 ou o NOD2 recrutam diretamente a serina-treonina quinase RIPK2 [também conhecida como proteína 2 de interação com o receptor (RIP2)] através de interações CARD-CARD (INOHARA *et al.*, 1999; INOHARA *et al.*, 2000; OGURA *et al.*, 2001). Confirmando a importância da sinalização do NOD1 e NOD2 via RIPK2, células provenientes de animais deficientes para a molécula RIPK2 não eram capazes de ativar o NF- $\kappa$ B após estímulo com os ligantes de NOD1 ou NOD2 (KOBAYASHI *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2007a). A RIPK2 se liga diretamente ao modulador essencial de NF- $\kappa$ B (NEMO)

[também conhecido como inibidor do NF- $\kappa$ B quinase  $\gamma$  (IKK $\gamma$ )], a subunidade reguladora da IKK, e promove a sua ubiquitination e ativação da subunidade catalítica IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  (INOHARA *et al.*, 2000; ABBOTT *et al.*, 2004). Uma vez ativada, a IKK fosforila o inibidor I $\kappa$ B, levando à sua degradação através do proteassoma, liberando NF- $\kappa$ B e permitindo que ele transloque para o núcleo (HAYDEN; GHOSH, 2004).

A sinalização através de NF- $\kappa$ B e MAPKs produz uma resposta inflamatória robusta. A estimulação de NOD1 ou NOD2 resulta na secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas [IL-6, CXCL8/IL-8, CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, CCL2, CCL5 e RANTES] (KIM; LEE; KAGNOFF, 2004; TRAVASSOS *et al.*, 2005; MASUMOTO *et al.*, 2006; WELTER-STAHN *et al.*, 2006; WERTS *et al.*, 2007; BUCHHOLZ; STEPHENS, 2008). A ativação de NOD1 induz o recrutamento de neutrófilos *in vivo* (MASUMOTO *et al.*, 2006) e a sinalização via NOD1 e NOD2 leva à produção de peptídeos antimicrobianos (BOUGHAN *et al.*, 2006; VOSS *et al.*, 2006; UEHARA *et al.*, 2007; ZILBAUER *et al.*, 2007).



**Figura 3. Representação esquemática da via de sinalização do membro 2 de domínio de oligomerização de nucleotídeo (NOD2).** O receptor tipo NOD (NLR) NOD2 reconhece fragmentos de peptidoglicano bacteriano (PGN) como o muramyl dipeptídeo (MDP) e leva a ativação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e de proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPKs), culminando na transcrição de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos.

### 1.2.2. NOD1 e NOD2 na imunidade inata e adaptativa

O reconhecimento de bactérias induz a ativação de múltiplos PRRs, incluindo NLRs e TLRs. Há evidências de que o NOD1 e o NOD2 cooperam com os TLRs na elaboração da resposta do hospedeiro a bactérias. O NOD1, o NOD2 e os TLRs convergem para vias de sinalização comuns, incluindo a ativação de NF- $\kappa$ B e MAPK, e a sinergia na ativação desses PRRs leva a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas antimicrobianas (CHAMAILLARD *et al.*, 2003; FRITZ *et al.*, 2005; TADA *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2007b).

Derivados de MDP (ligante NOD2) e iE-DAP (ligante NOD1) são conhecidos há mais de duas décadas como adjuvantes da produção de IgG antígeno-específicos (SUGAWARA *et al.*, 1995). A análise de análogos estereoisoméricos do MDP revelou uma boa correlação entre o reconhecimento e a atividade adjuvante mediada através do NOD2 (GIRARDIN *et al.*, 2003b; INOHARA *et al.*, 2003). De fato, a capacidade do MDP em induzir resposta IgG ovalbumina (OVA)-específica é abolida em camundongos NOD2 deficientes (KOBAYASHI *et al.*, 2005). O mecanismo pelo qual o MDP exerce atividade adjuvante é pouco compreendido, porém dados da literatura sugerem que ela possa ser mediada, pelo menos em parte, através da expressão de moléculas co-estimulatórias nos monócitos e células dendríticas que medeiam a diferenciação de células T naive em células T efetoras (HEINZELMANN *et al.*, 2000; TODATE *et al.*, 2001; NAU *et al.*, 2002). Além disso, o MDP aumenta a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> em células T-helper 17 (T<sub>H</sub>17) (VAN BEELEN *et al.*, 2007). Estudos recentes têm previsto uma nova visão sobre a função do NOD1 na ativação da imunidade adaptativa. O NOD1 contribui para a atividade adjuvante induzida pelo adjuvante completo de Freund, um extrato bruto

da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* (FRITZ *et al.*, 2007). Nesse ínterim, e não menos interessante, dados da literatura apontam que a administração de agonista de NOD1 juntamente com o antígeno é suficiente para conduzir a uma imunidade adaptativa com padrão de resposta T<sub>H</sub>2 antígeno-específica (FRITZ *et al.*, 2007).

### 1.2.3. O inflamassoma

Caspases são uma família de cisteínas proteases intracelulares que clivam um número limitado de substratos. As caspases humanas podem ser divididas em dois grupos diferentes, com base em sua função biológica: as caspases pró-inflamatórias (caspase-1, -4, -5, -11 e -12), e as caspases pró-apoptóticas (caspase-2, -3, -7, -8, -9 e -10) (NICHOLSON, 1999). A caspase-1 foi a primeira a ser identificada e está presente no citosol das células fagocíticas como um zimogeno inativo (CERRETTI *et al.*, 1992; THORNBERRY *et al.*, 1992). Após a estimulação por uma variedade de sinais microbianos e endógenos, a molécula de pró-caspase-1 inativa é auto-ativada por clivagem proteolítica no heterodímero enzimaticamente ativo composto de uma cadeia 10- e 20-kDa (YAMIN; AYALA; MILLER, 1996; MARTINON; TSCHOPP, 2007). A ativação da caspase-1 é essencial para o processamento de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 e secreção de suas formas biologicamente ativas (KUIDA *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1995; GHAYUR *et al.*, 1997). Um passo crucial na ativação da caspase-1 é a montagem de um grande complexo protéico que inclui os NLRs, o adaptador associado a apoptose contendo um CARD C-terminal (ASC) e a pró-caspase-1 (MARTINON *et al.*, 2004; LAMKANFI *et al.*, 2007). Esta plataforma molecular foi denominada *inflamassoma*, como uma analogia ao *apoptossomo*, a

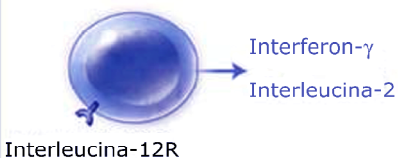
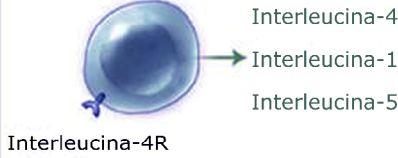
plataforma de proteína que dirige a ativação da caspase-9 durante a apoptose (INOHARA; NUNEZ, 2003; INOHARA *et al.*, 2005).

Estudos genéticos utilizando macrófagos de camundongos deficientes em genes NLR mostraram que NLRC4, NLRP3 e NLRP1b são necessários para a ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 $\beta$  em resposta a estímulos microbianos. Fagócitos, incluindo monócitos e macrófagos, expressam pouca ou nenhuma pró-IL-1 $\beta$ , e a indução desta citocina é mediada pela ativação da transcrição do gene da IL-1 $\beta$  em resposta à estimulação microbiana através de TLRs e NOD2, porém necessitando de mais estudos sobre a participação desses últimos no inflamassoma. Assim, a secreção de IL-1 $\beta$  requer duas etapas, a indução de pró-IL-1 $\beta$  e o processamento de pró-IL-1 $\beta$ , que são regulados de forma independente por classes distintas de PRRs e de vias intracelulares.

### 1.3. Células T “helper”

Em 1986, Mosmann e Coffman introduziram o conceito da existência de diferentes tipos de células T-helper baseado nos tipos de citocinas que as células T produzem quando são estimuladas a se diferenciar. Eles batizaram os diferentes tipos de células T como linfócitos T-helper 1 (células T<sub>H</sub>1) e T-helper 2 (T<sub>H</sub>2) (MOSMANN; COFFMAN, 1989). As células T<sub>H</sub>1 produzem grandes quantidades de interferon- $\gamma$ , induzem reações de hipersensibilidade retardadas, ativam macrófagos, e são essenciais para a defesa contra patógenos intracelulares (cf.: **figura 4**). As células T<sub>H</sub>2 produzem principalmente IL-4 e são importantes na indução da produção de IgE, no recrutamento de eosinófilos para os locais de inflamação; além disso, elas ajudam na eliminação de infecções parasitárias (cf.: **figura 4**). Estas distinções permitiram a atribuição de um fenótipo funcional específico para as células T-helper

baseado nas citocinas efetoras que elas produzem. A produção de citocinas efetoras fundamenta o termo "células efetoras T-helper".

| Grupo T <sub>H</sub> | Produtos Celulares                                                                                                                                                                  | Células Alvo                                                                                                            | Agentes Infecciosos                         |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| T <sub>H</sub> 1     | <br>Interleucina-12R<br>Interferon-γ<br>Interleucina-2                                             | <br>Macrófagos<br>Células Dendríticas | Bactérias intracelulares<br>Fungos<br>Vírus |
| T <sub>H</sub> 17    | <br>Interleucina-23R<br>Interleucina-17A<br>Interleucina-17F<br>Interleucina-21<br>Interleucina-22 | <br>Neutrófilos                       | Bactérias extracelulares<br>Fungos          |
| T <sub>H</sub> 2     | <br>Interleucina-4R<br>Interleucina-4<br>Interleucina-13<br>Interleucina-5                        | <br>Eosinófilos<br>Basófilos         | Parasitas                                   |

**Figura 4. Subgrupos de células T helper (T<sub>H</sub>) e funções efetoras.** O perfil de citocinas (incluindo os principais receptores de citocinas como indicada por R), o tipo de células efetoras que são ativadas e os correspondentes tipos de infecções.

### 1.3.1. Origens e Funções das Células T<sub>H</sub>17

#### 1.3.1.1. Subgrupos de células T-helper

Recentemente, foi demonstrado que as células T podem produzir citocinas que não são classificadas de acordo com o padrão T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2. A IL-17 estava entre essas citocinas (YAO *et al.*, 1995) e as células T, que preferencialmente produzem IL-17, mas não o interferon-γ ou a IL-4, foram nomeadas células T<sub>H</sub>17 (HARRINGTON *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005). Uma vez que estas células T

constituem uma linhagem distinta, agora existem três tipos de células T-helper efetoras: T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 e T<sub>H</sub>17 (BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007) (cf.: **figura 4**).

O mecanismo de indução e as funções efetoras desta nova classe de células T efetoras estão apenas começando a ser entendidos. Sua função na liquidação de organismos infecciosos, o seu papel na indução de inflamação e os eventos moleculares que fazem com que diferenciem são o foco de importantes estudos em imunologia. Como as células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, as células T<sub>H</sub>17 produzem um grupo de citocinas distintas, o qual inclui a IL-17 (também chamada IL-17A), a IL-17F, a IL-22 e a IL-21, todas participando da orquestração de um tipo específico de resposta inflamatória.

#### 1.3.1.2. Diferenciação de células T<sub>H</sub>17

As primeiras descobertas envolvendo as células T<sub>H</sub>17 foram feitas em camundongos. Embora existam analogias importantes para o desenvolvimento de células T<sub>H</sub>17 em humanos, algumas diferenças foram observadas. Citocinas produzidas por células do sistema imunológico inato governam a diferenciação das células T-helper. As células do sistema imune inato são a primeira linha de defesa contra patógenos – seus PRRs, que não são específicos para um determinado epítipo particular, permitem-lhes responder a uma grande variedade de invasores microbianos através da produção de citocinas que ativam as células T do sistema imune adaptativo. O interferon- $\gamma$  e a IL-12 dirigem as células T naíve para o padrão T<sub>H</sub>1, enquanto a IL-4 inicia a diferenciação de células T naíve em células T<sub>H</sub>2 (GLIMCHER; MURPHY, 2000) (cf.: **figura 5**). Em nível molecular, a diferenciação de células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 exige fatores de transcrição específicos: O T-bet para as células T<sub>H</sub>1 (SZABO *et al.*, 2000), o GATA3 e o C-Maf para as células T<sub>H</sub>2 (HO *et al.*, 1996;

ZHENG; FLAVELL, 1997). Esses fatores ativam os genes das citocinas que são a marca das células  $T_H1$  e  $T_H2$ , o IFN- $\gamma$  e a IL-4, respectivamente (cf.: **figura 5**).

A IL-12 também é importante para a diferenciação de células  $T_H1$  por possuir duas subunidades, a p35 e a p40. Outra proteína, a p19, que não tem atividade própria, combina-se com a subunidade p40 da IL-12 para formar uma única citocina heterodimérica chamada IL-23 (OPPMANN *et al.*, 2000). Assim, a IL-12 e a IL-23 têm em comum a subunidade p40, mas elas também têm suas subunidades únicas, a p35 (IL-12) e a p19 (IL-23). Em estudos com camundongos deficientes para IL-23 ou IL-12, a falta de IL-23 deixou os animais altamente resistentes ao desenvolvimento de autoimunidade e inflamação, enquanto que a perda de IL-12 não apresentou esse resultado (CUA *et al.*, 2003; MURPHY *et al.*, 2003). Dessa forma, esses resultados sugerem que a IL-12 e as células  $T_H1$  não são necessárias para a indução da inflamação autoimune, mas sim a IL-23. Esses estudos também sugerem que as células T, que se diferenciam sob a influência da IL-23, são peças fundamentais na indução de autoimunidade. Esse conceito é constatado por experimentos em que a indução da inflamação e da autoimunidade em camundongos foi possível graças à injeção de células T produtoras de IL-17 que haviam sido induzidas a se diferenciar e proliferar *in vitro* após tratamento com IL-23 (LANGRISH *et al.*, 2005). Assim, parece que o eixo IL-23/ $T_H17$  é uma via essencial para a indução de doenças autoimunes.

A IL-23 pode expandir populações de células  $T_H17$  *in vitro*, mesmo quando essas células T são deficientes em fatores de transcrição das células  $T_H1$  e  $T_H2$  (YAO *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 2005); essas observações confirmam que as células  $T_H17$  são uma linhagem distinta daquelas células  $T_H1$  ou  $T_H2$ . A constatação de que a IL-23 é uma citocina responsável pela diferenciação de células  $T_H17$  constituiu um

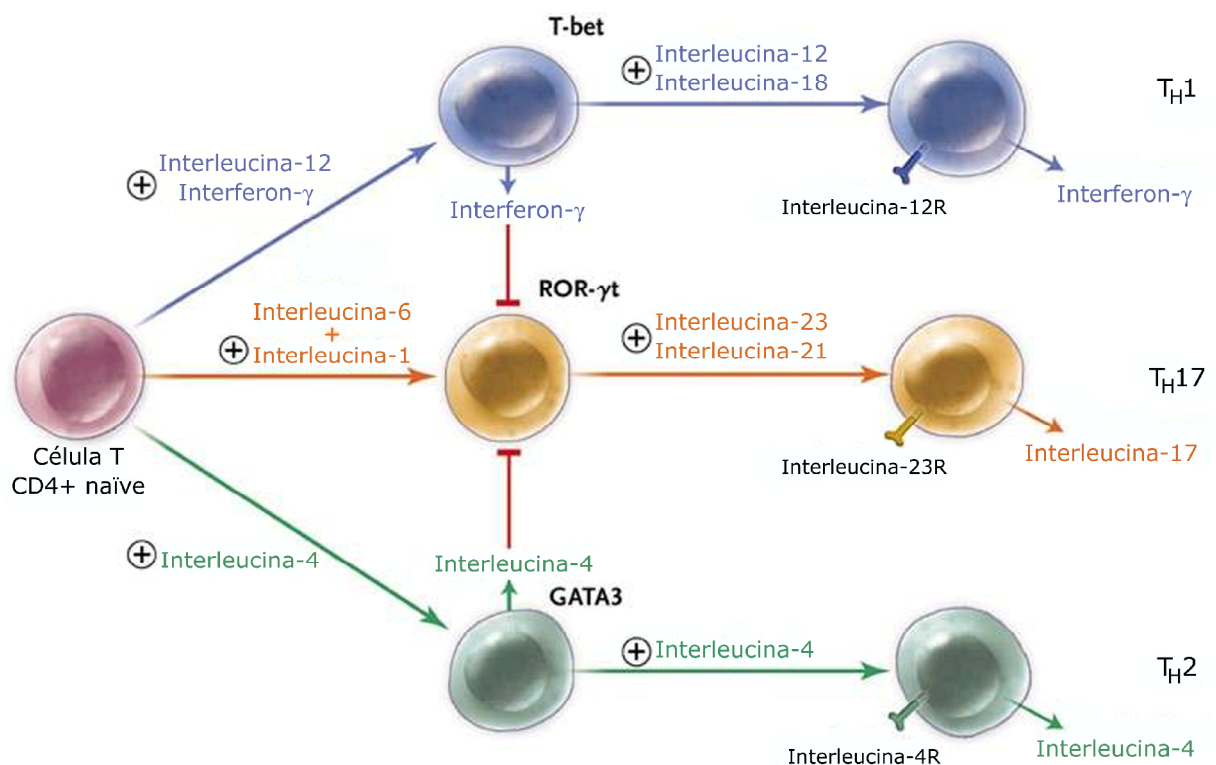


grave problema conceitual, pois as células T naíve não expressam receptores para IL-23, assim células T naíve não podem se diferenciar em células T<sub>H</sub>17 na presença de IL-23 (MANGAN *et al.*, 2006).

O problema tomou novo rumo quando, simultaneamente, três grupos independentes descobriram que uma combinação de TGF- $\beta$  e IL-6 induzia a diferenciação de células T naíve em células T<sub>H</sub>17 (BETTELLI *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006; VELDHOFEN *et al.*, 2006). Esta conclusão foi surpreendente, pois o TGF- $\beta$  era classificada como uma citocina imunossupressora, não como uma indutora de diferenciação das células T. Além disso, as células T naíve que são expostas somente ao TGF- $\beta$  vem a expressar Foxp3, que é o fator de transcrição mestre indutor de células T-reguladoras (T<sub>reg</sub>), as quais suprimem a inflamação e inibem a autoimunidade (LI *et al.*, 2006). Uma constatação relevante é que a IL-6 é um potente inibidor da ação do TGF- $\beta$  em induzir a diferenciação de células T<sub>reg</sub> Foxp3<sup>+</sup> (BETTELLI *et al.*, 2006). A IL-6 não só suprime a geração destas T<sub>reg</sub>, mas, em conjunto com o TGF- $\beta$ , induz células T naíve a expressar a IL-17 e tornarem-se células T<sub>H</sub>17. Mais recentemente, foi demonstrado que TGF- $\beta$  não promove a diferenciação de células T<sub>H</sub>17, mas, sim, age indiretamente ao bloquear a expressão dos fatores de transcrição STAT4 e GATA3, assim prevenindo a diferenciação das células T naíve em células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, respectivamente (DAS *et al.*, 2009).

As células T<sub>H</sub>17 são as únicas a expressar o fator de transcrição ROR- $\gamma$ t (IVANOV *et al.*, 2006), que induz a transcrição do gene da IL-17 nas células naíve T-helper e é necessário para o desenvolvimento das células produtoras de IL-17 na presença da IL-6 (ZHOU *et al.*, 2008). O ROR- $\gamma$ t deve agir em cooperação com outros fatores de transcrição, incluindo o ROR- $\alpha$ , o STAT3, o IRF-4, e o Runx1, para um total comprometimento dos precursores da linhagem de células produtoras de IL-

17 (BRUSTLE *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; YANG, X. O. *et al.*, 2008; ZHANG; MENG; STROBER, 2008). A ativação do ROR- $\gamma$ t induz a expressão do receptor de IL-23, indicando que a IL-23 atua sobre células T que são T<sub>H</sub>17. A exposição de células T<sub>H</sub>17 a IL-23 não só aumenta a expressão de IL-17, mas também induz a produção de IL-22 e suprime a IL-10 e o IFN- $\gamma$ , que não são normalmente associados com o fenótipo T<sub>H</sub>17 (MCGEACHY *et al.*, 2007). Assim, a IL-23 é essencial para estabilizar o fenótipo T<sub>H</sub>17.



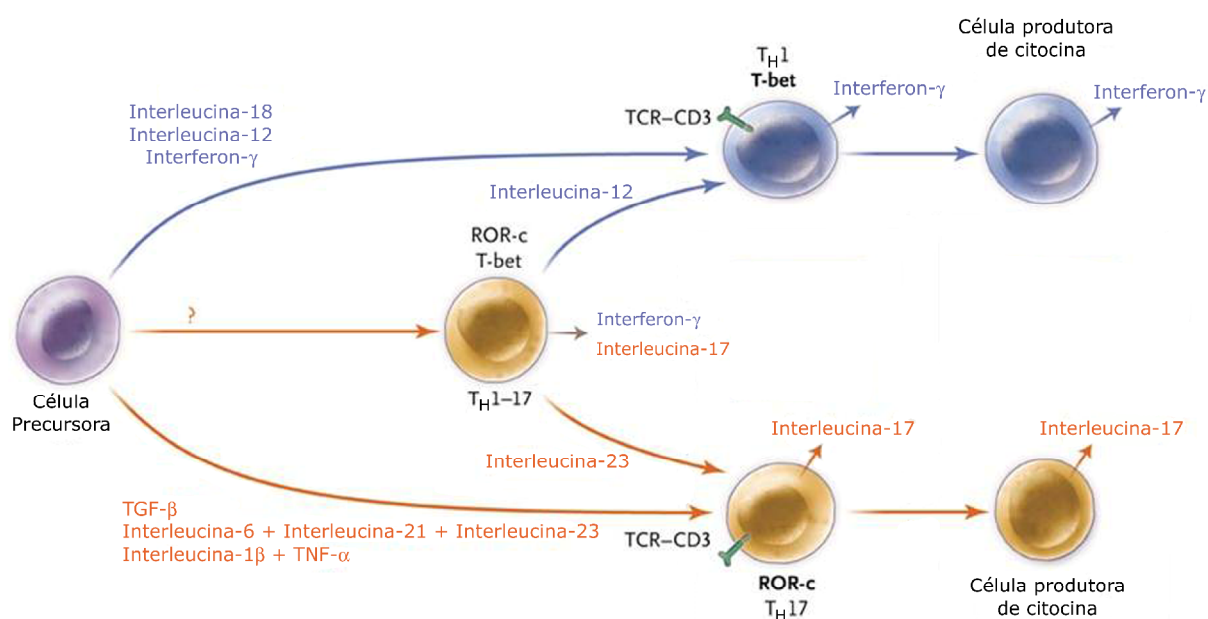
**Figura 5. Diferenciação de células T<sub>H</sub> de camundongos.** As células T naíve de camundongos podem diferenciar-se em um dos três tipos de células T-helper (T<sub>H</sub>) efectoras. Cada via de diferenciação está sob o controle de um conjunto diferente de citocinas. A via T<sub>H</sub>17 está sob o controle da IL-6 e IL-1 $\beta$ , seguido de IL-21 e IL-23. Esta via é inibida pelo IFN- $\gamma$  ou IL-4. O fator de transcrição (T-bet, ROR- $\gamma$ t ou GATA3) caracteriza cada percurso. R = receptor

O IFN- $\gamma$  e a IL-4 são produzidos pelas células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, respectivamente, e amplificam a diferenciação dessas células autocrinamente. A IL-17, em

contrapartida, não é nem fator de crescimento nem fator de diferenciação de células  $T_H17$ ; assim, ela não pode amplificar respostas  $T_H17$ . No entanto, um membro da família da IL-2, a IL-21, que é produzida em grandes quantidades por células  $T_H17$ , pode juntamente com TGF- $\beta$ , ampliar a diferenciação de células  $T_H17$  (KORN *et al.*, 2007; NURIEVA *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2007) (cf.: **figura 5**).

#### 1.3.1.3. Células $T_H17$ humanas

Inicialmente, o TGF- $\beta$  juntamente com a IL-6 não eram considerados fatores para diferenciação de células  $T_H17$  humanas. Pelo contrário, pensava-se que a geração de células  $T_H17$  humanas a partir de células precursoras naïve era inibida pelo TGF- $\beta$  e promovida pela IL-6 mais IL-1 $\beta$  (ACOSTA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007a; WILSON *et al.*, 2007). Os estudos que determinaram estas ideias, no entanto, não usaram células T naïve genuínas como população de partida e também não controlaram fontes endógenas de TGF- $\beta$ , tais como soro e plaquetas. Quando células T naïve provenientes do sangue de cordão umbilical foram cultivadas em meio sem soro, a geração de células  $T_H17$ , como resultado da interação entre o TGF- $\beta$  e citocinas inflamatórias, foi confirmada (MANEL; UNUTMAZ; LITTMAN, 2008; YANG, L. *et al.*, 2008). Resultados da literatura indicam que o TGF- $\beta$  mais IL-21 (YANG, L. *et al.*, 2008), além de TGF- $\beta$  em combinação com IL-6 e IL-23, ou IL-6 com IL-21 (MANEL; UNUTMAZ; LITTMAN, 2008) podem induzir a expressão do ROR-c, o homólogo humano do ROR- $\gamma$ t murino (cf.: **figura 6**).



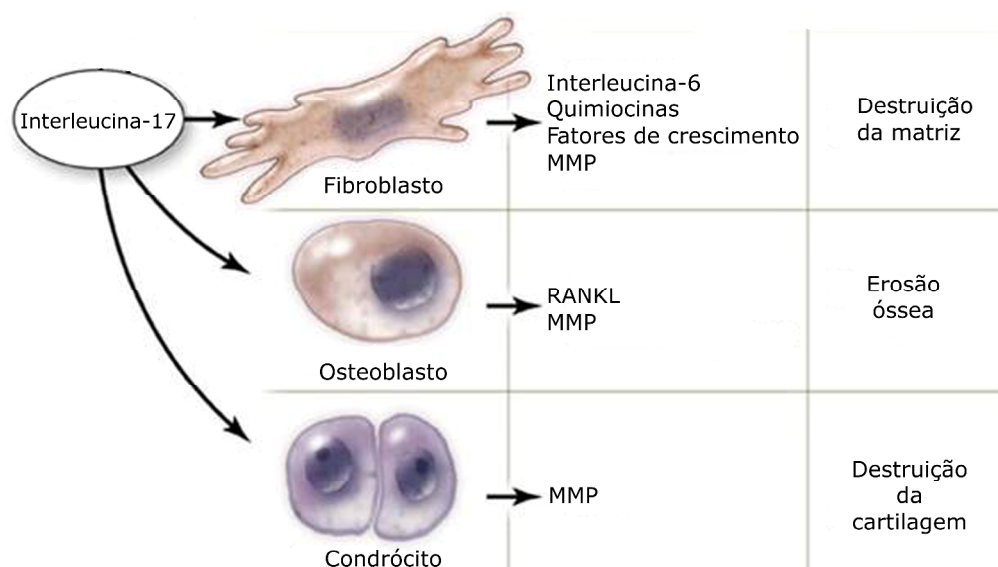
**Figura 6. Diferenciação de células T<sub>H</sub>17 humanas.** As citocinas essenciais para o desenvolvimento de células T<sub>H</sub>17 humanas são o TGF-β, a IL-6, a IL-21, e as citocinas inflamatórias IL-1β, seguido da IL-23. Em adição aos subgrupos clássicos T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>17, um subgrupo misto T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>17 foi identificado, o qual expressa tanto o T-bet quanto o ROR-c.

### 1.3.2. Interleucina-17 e células T<sub>H</sub>17 na doença

#### 1.3.2.1. O eixo IL-23/T<sub>H</sub>17 na inflamação crônica e na autoimunidade

As respostas T<sub>H</sub>17 desreguladas ou a produção elevada de IL-17 por células T, e de outras fontes, estão associadas à inflamação crônica e condições imunopatológicas severas. A IL-17 foi apontada primeiramente como indutora da produção de IL-6 em fibroblastos (YAO *et al.*, 1995) e em sinoviócitos cultivados de pacientes com artrite reumatóide (CHABAUD *et al.*, 1998) (cf.: **figura 7**). A maioria das células do parênquima expressa receptores de IL-17 (KOLLS; LINDEN, 2004) e a sinalização via esses receptores induz as células-alvo a produzirem fatores pró-

inflamatórios como a IL-6, a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$ , a CXCL8 (IL-8) e as metaloproteinases (YAO *et al.*, 1995; FOSSIEZ *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2005). Através da produção de proteinases da matriz, a IL-17 também pode destruir a matriz extracelular e causar reabsorção óssea. No osso, a IL-17 estimula os osteoblastos a expressar o ativador do receptor do fator nuclear- $\kappa$ B (RANK) ligante (RANKL) (PAGE; MIOSSEC, 2005). Tais osteoblastos podem ativar os osteoclastos, que expressam a proteína da membrana RANK, um receptor para o RANKL, em sua superfície. As células T<sub>H</sub>17 também expressam RANKL, mas não são capazes de ativar os osteoclastos pela interação RANKL-RANK. Pelo contrário, a secreção de IL-17 por células T<sub>H</sub>17 e a indução de RANKL em células como osteoblastos, que apoiam a ativação dos osteoclastos, parecem ser necessárias para a perda óssea. Através do sistema RANKL-RANK, a IL-17 pode ter um papel importante na artrite reumatóide (SATO *et al.*, 2006). Assim, na artrite reumatóide, a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17 por células sinoviais é preditivo de destruição articular (KIRKHAM *et al.*, 2006).



**Figura 7. Efeitos da IL-17 sobre as funções celulares e seu papel na fisiopatologia da AR.** O painel mostra o efeito da interleucina-17, o tipo de célula alvo envolvida, os produtos liberados pela célula-alvo em resposta a interleucina-17, e os efeitos biológicos.

A IL-6 é um alvo de IL-17 e também um fator de diferenciação de células T<sub>H</sub>17. Induzindo a produção de IL-6 e IL-1 $\beta$ , a IL-17 ativa um ciclo de *feedback* positivo que compromete as células T naíve à linhagem T<sub>H</sub>17. Além disso, ao induzir a produção de quimiocinas, as células T<sub>H</sub>17 atraem numerosas células T efetoras para o tecido inflamado; agindo em sinergia com TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , a IL-17 é um potente indutor da quimiocina CCL20, que é fortemente quimiotática para linfócitos, incluindo as células T<sub>H</sub>17. Estas células T<sub>H</sub>17 são atraídas para os sítios inflamatórios através do CCR6, o receptor para CCL20, que é detectado em células T<sub>H</sub>17 (ACOSTA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007b). Além disso, quimiocinas como a proteína 10 induzida por interferon (IP-10), um membro da família de quimiocinas CXC, atrai outras células imunes como as células T<sub>H</sub>1 e monócitos para os tecidos inflamados (KHADER *et al.*, 2007).

Há evidências de que, além da artrite reumatóide (KIRKHAM *et al.*, 2006), as células T<sub>H</sub>17 estão envolvidas na psoríase (KRUEGER *et al.*, 2007), na esclerose múltipla (MATUSEVICIUS *et al.*, 1999) e na doença inflamatória intestinal (DUERR *et al.*, 2006). Elas também podem participar no desenvolvimento da asma resistente a corticosteróide (MOLET *et al.*, 2001; BARCZYK; PIERZCHALA; SOZANSKA, 2003).

#### 1.4. Neutrófilos

Os neutrófilos são os principais leucócitos recrutados nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios, incluindo a artrite reumatóide e, geralmente, permanecem no local da injúria por cerca de 12-24 horas. Em seguida, os neutrófilos iniciam um processo de morte programada denominado *apoptose*, que culmina,

consequentemente, na fagocitose destes leucócitos polimorfonucleares por macrófagos. Decorridas aproximadamente dez horas a partir do início do processo inflamatório, começam a surgir progressivamente eosinófilos, macrófagos e linfócitos no local da inflamação, permanecendo no sítio por cerca de uma semana, caso o agente agressor seja removido. Em caso contrário, o processo evoluirá para a cronificação.

O curso da migração tem início com o rolamento e subsequente adesão dos leucócitos ao endotélio das vênulas. Mediadores inflamatórios como a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$ , o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), a histamina, o C5a e as quimiocinas aumentam a aderência entre os neutrófilos e as células endoteliais (FRICKE; DAMERAU; VOGT, 1985; MCINTYRE; ZIMMERMAN; PRESCOTT, 1986; MANTOVANI; DEJANA, 1987; LEHRER *et al.*, 1988; MCMILLAN; FOSTER, 1988). Essas substâncias quimioatraentes formam um gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares, contribuindo para a adesão dos neutrófilos às células endoteliais e, por conseguinte, iniciando o rolamento desses leucócitos sobre o endotélio vascular. A expressão de moléculas protéicas, denominadas coletivamente de *moléculas de adesão*, na membrana dos leucócitos e das células endoteliais, aumenta a aderência entre essas células. Assim, ligações fracas entre essas moléculas de adesão, pertencentes à família das *selectinas* (L-selectina nos neutrófilos e P- e E-selectina nas células endoteliais), promoverão redução na velocidade com que esses leucócitos transitam pelos vasos sanguíneos após sua ativação e consequente rolamento. Em sequência, ligações entre integrinas, complementares dos neutrófilos e do endotélio, aumentarão a intensidade desta adesão: as  $\beta_2$ -integrinas se ligarão a moléculas da superfamília das imunoglobulinas, como a VCAM-1, a PECAM-1 e a ICAM-1, mediando uma adesão mais firme e

permitindo que os neutrófilos migrem para os tecidos subjacentes através de espaços abertos entre as células endoteliais (processo conhecido como *diapedese*), ou através de fissuras formadas nas próprias células endoteliais (processo denominado *migração transendotelial*), dirigindo-se ao foco da lesão (ZIMMERMANN, 1983; HUTTENLOCHER; SANDBORG; HORWITZ, 1995; RADI; KEHRLI; ACKERMANN, 2001; LEY, 2002).

Os neutrófilos são responsáveis pela liberação de elastase e proteases, que degradam o proteoglicano presente na camada superficial de cartilagem (MOORE *et al.*, 1993), o que provavelmente ocorre após chegarem ao sítio inflamatório articular. A depleção de proteoglicanos possibilita que os imunocomplexos precipitem sobre a camada superficial de colágeno e ocorra exposição dos condrócitos (JASIN; TAUROG, 1991). Condrócitos e fibroblastos sinoviais liberam metaloproteinases quando estimulados com IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ou ativados por células T CD4+. As metaloproteinases de matriz, em particular a estromelisina e as collagenases, são enzimas apontadas como as principais mediadoras do dano articular na AR.

Os neutrófilos possuem ainda um sistema enzimático oxidativo acoplado à membrana plasmática (NADPH oxidase), responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo que transfere elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo-o a ânion superóxido (SLATER, 1984; BELLAVITE, 1988; RUBANYI, 1988), o qual pode ser convertido rapidamente em peróxido de hidrogênio e, subsequentemente, em radicais hidroxilas, denominados genericamente de *intermediários reativos do oxigênio* (MALECH; GALLIN, 1987).

O óxido nítrico (NO) é outra substância reativa utilizada por neutrófilos para exercer função microbicida, e foi observado que essas células utilizam o NO no processo de digestão de fungos e bactérias (FIERRO *et al.*, 1996; FIERRO *et al.*,



1999). Além disso, outra atividade atribuída ao NO é a capacidade de bloquear a ligação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ao DNA celular, impedindo a síntese da quimiocina IL-8 e inibindo, desta forma, o recrutamento de neutrófilos (FOWLER *et al.*, 1999). Dados obtidos em nosso laboratório demonstraram recentemente que o NO também inibe a migração de neutrófilos por interferir no rolamento e adesão desses ao endotélio das vênulas, levando, conseqüentemente, à apoptose dos neutrófilos emigrados (SECCO *et al.*, 2003). Além disso, também foi demonstrado que o NO está implicado na destruição dos tecidos adjacentes ao foco infeccioso ou inflamatório (MACHLIN; BENDICH, 1987).

***Objetivos***

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi analisar a participação dos receptores NOD1 e NOD2, bem como de suas possíveis moléculas sinalizadoras, RIPK2 e caspase-1, no desenvolvimento da artrite induzida por antígeno e na artrite reumatóide. Além disso, procuramos focar a participação das células produtoras de IL-17 e a participação dos receptores NOD1 e NOD2 na modulação da produção desta citocina no processo da artrite.

# ***Materiais e Métodos***

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo comitê de ética para experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e com as diretrizes para uso de animais experimentais em estudos de dor da IASP (ZIMMERMANN, 1983).

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos C57Bl/6 e deficientes para NOD1, NOD2, RIPK2 e caspase-1, pesando entre 18 e 22 g. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22-25°C), sem restrição hídrica ou dietética (*ad libitum*) e ciclo claro/escuro controlados.

#### **3.2. Avaliação Nociceptiva**

Os testes nociceptivos foram realizados entre 8:00 e 17:00 h.

##### **3.2.1. Medida de Hipernocicepção Mecânica em Patas de Camundongos:**

##### **Teste de Pressão Crescente na Pata (von Frey eletrônico).**

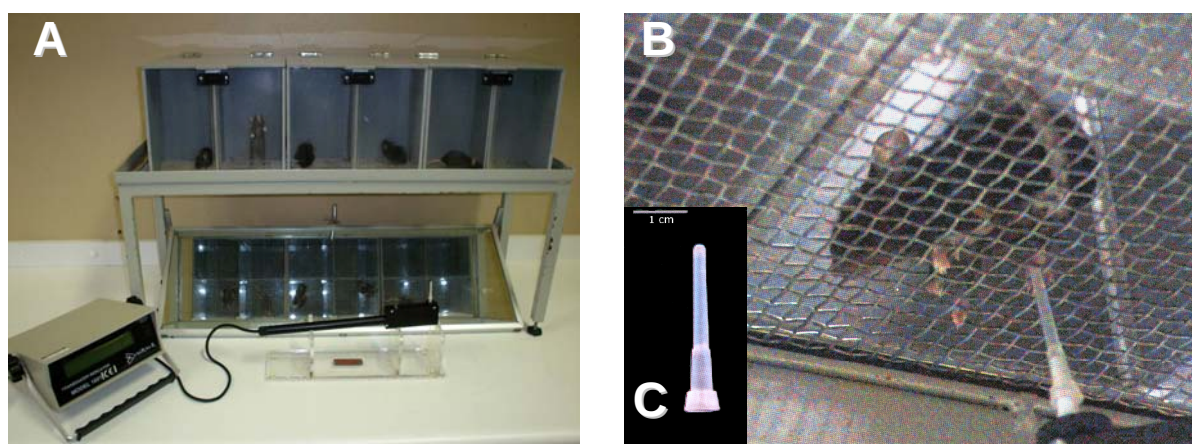
A avaliação da hipernocicepção mecânica na articulação fêmur-tibial foi realizada por modificação do método de flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal de camundongos, como descrito por Guerrero et al. (2006). Desse modo, foi possível

avaliar a hipernocicepção e migração de neutrófilos de forma direta (lavado da cavidade articular) no mesmo sítio inflamatório; ao contrário da articulação tíbio-tarsal, na qual a migração de neutrófilos é avaliada indiretamente pela atividade mieloperoxidase devido à dificuldade técnica de se realizar um lavado dessa articulação. O método descrito por Guerrero et al. (2006) foi baseado no método eletrônico de quantificação da intensidade da nocicepção inflamatória em camundongo descrito por Cunha et al. (2004), conforme delineado abaixo.

A avaliação da hipernocicepção mecânica foi realizada conforme previamente descrito (CUNHA *et al.*, 2004). Resumidamente, este método utiliza-se de um anesthesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, IITC Life Science Instruments, CA, USA, Figura 8A). Este aparelho é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. A captação da pressão é feita pelo contato da ponteira de polipropileno com área de  $4,15 \text{ mm}^2$  à pata (cf.: figura 8, B - C); dessa forma, não há estimulação do tecido cutâneo plantar, mas, sim, flexão da articulação fêmur-tibial. O experimentador é treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal, com uma pressão gradualmente crescente, até que provoque uma resposta de flexão característica com a retirada da pata. O estímulo é, então, interrompido e a força exercida para promover a resposta característica é registrada.

Foram realizadas três medidas distintas para cada animal, antes e após a administração dos estímulos, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na força ( $\Delta$  de reação em gramas) e obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora), do valor de reação após a administração dos estímulos hipernociceptivos que variam de acordo com o experimento.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas acrílicas medindo  $12 \times 10 \times 17$  cm, com assoalho formado por uma rede de malhas medindo cerca de  $5 \text{ mm}^2$  constituída de arame não maleável de 1 mm de diâmetro. As caixas foram mantidas a cerca de 25 cm da superfície de uma bancada, de modo a permitir a estimulação mecânica da pata traseira dos animais. Antes do início dos experimentos os animais permaneceram nessas caixas por 15 min. para a adaptação.



**Figura 8. Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongos. Painel A-** A foto apresenta o anestesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science Instruments CA, USA), as caixas de acrílico, o assoalho em rede de malhas e o espelho, utilizados no teste de pressão crescente na pata. **Painel B-** A foto apresenta a ponteira de área ( $4,15 \text{ mm}^2$ ) em contato com a pata do animal. O experimentador aplica, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal emita o comportamento nociceptivo. **Painel C-** Foto ilustrativa da ponteira de polipropileno.

### 3.3. PREPARO DE SOLUÇÕES, DROGAS E REAGENTES:

#### 3.3.1. Solução de tampão salina-fosfato (PBS)

|                                                                     |        |
|---------------------------------------------------------------------|--------|
| Cloreto de Sódio (NaCl, Merck).....                                 | 8,0 g  |
| Cloreto de Potássio (KCl, Merck).....                               | 0,2 g  |
| Fosfato de Sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Merck)..... | 1,15 g |

|                                                                         |       |
|-------------------------------------------------------------------------|-------|
| Fosfato de Potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck)..... | 0,2 g |
| Água Milli-Q q.s.p.....                                                 | 1 L   |

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução final autoclavada e estocada em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

### 3.3.2. PBS/EDTA (1mM)

|                   |         |
|-------------------|---------|
| PBS.....          | 100 mL  |
| EDTA (Merck)..... | 37,2 mg |

### 3.3.3. PBS heparinizado

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| PBS.....                          | 100 mL |
| Heparina (Roche, 5000 UI/mL)..... | 0,1 mL |

### 3.3.4. Líquido de Turk

|                                          |       |
|------------------------------------------|-------|
| Ácido acético glacial P.A. (Merck) ..... | 20 mL |
| Azul de metileno (Merck).....            | 0,5 g |
| Água Milli-Q q.s.p.....                  | 1 L   |



### 3.3.5. Corante Panótico Rápido (LaborClin)

Panótico rápido nº 1: solução de triarilmetano 0,1%;

Panótico rápido nº 2: solução de xantenos 0,1%;

Panótico rápido nº 3: solução de tiazinas 0,1%.

### 3.3.6. Solução de Tris (0,1 M)

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris (Sigma)..... | 6,1 g |
|-------------------|-------|

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Água Milli-Q q.s.p..... | 500 mL |
|-------------------------|--------|

### 3.3.7. Azul de Trypan

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Trypan blue (Sigma)..... | 100 mg |
|--------------------------|--------|

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Água Milli-Q q.s.p..... | 100 mL |
|-------------------------|--------|

### 3.3.8. Tampão de Lise

#### Solução I

|                               |                       |
|-------------------------------|-----------------------|
| Cloreto de Amônio 0,16 M..... | 8,3 g.L <sup>-1</sup> |
|-------------------------------|-----------------------|

## Solução II

Tris 0,17 M..... 20,6 g.L<sup>-1</sup>

Misturar as duas soluções utilizando 9 partes da solução I para cada parte da solução II. Filtrar em Millipore 0,22 µm e armazenar à 4°C.

### 3.3.9. Meio de Cultura RPMI 1640 Incompleto

RPMI 1640 (Sigma)..... 10,4 g

Bicarbonato de Sódio P.A. (Merck)..... 2,2 g

Água Milli-Q q.s.p..... 1L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e o produto final estocado em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizado.

### 3.3.10. Meio de Cultura RPMI 1640 Completo

RPMI 1640 (Sigma)..... 10,4 g

Bicarbonato de Sódio P.A. (Merck)..... 2,2 g

Hepes (Sigma)..... 2,34 g

Penicilina/Gentamicina (Sigma)..... 150 UI/mL

Streptomicina (Sigma)..... 100 µg/mL

Água Milli-Q q.s.p.....1L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e o produto final estocado em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizado.

### **3.3.11. Meio de Cultura Iscove's**

|                                                               |        |
|---------------------------------------------------------------|--------|
| Iscove's (IMDM) com L-glutamina e 25 mM de HEPES (Sigma)..... | 17,7 g |
| Bicarbonato de Sódio P.A. (Merck).....                        | 3,02 g |
| Água Milli-Q q.s.p.....                                       | 1L     |

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e o produto final estocado em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizado.

### **3.3.12. Albumina Bovina Sérica Metilada (mBSA)**

A mBSA (Sigma) foi diluída em PBS ou em RPMI 1640 estéril uma hora antes de ser utilizada.

### **3.3.13. Adjuvante de Freund Completo (CFA – Sigma) e Incompleto (IFA – Sigma)**

### **3.3.14. Tampões utilizados para o ensaio de ELISA**

- Solução de ligação (binding buffer) pH 9.0

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)..... 0.1M

- **Tampão substrato pH 5.0**

Ácido cítrico (Merck)..... 34.7mM

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)..... 66.7 mM

- **Substrato**

OPD (Sigma)..... 0.4 mg

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck)..... 0.4μL

Tampão substrato q.s.p..... 1 mL

### 3.3.15. Drogas

- FK156 (Astellas Pharma);
- MDP (Sigma);
- IL-1ra (Calbiochem).

## 3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 3.4.1. Imunização e desafio com mBSA

Camundongos C57Bl/6 e deficientes para NOD1, NOD2, RIPK2 e caspase-1 foram imunizados com emulsão contendo volumes iguais (200 μL) de PBS e adjuvante completo de Freund (CFA), na qual foram dissolvidas 500 μg de mBSA,

administrada por meio de injeção subcutânea (s.c.). No 7º e no 14º dia após a primeira imunização, foi administrada (s.c.) emulsão com adjuvante incompleto de Freund (IFA), com o objetivo de reforçar a imunização. Os animais falso-imunizados receberam o mesmo tratamento aplicado aos demais, porém sem a administração de mBSA. No 21º dia, os animais imunizados foram desafiados com mBSA (10 ou 30 µg) administrada via intraarticular (i.a.).

### **3.4.2. Migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida por mBSA**

Seis ou vinte e quatro horas após o desafio, os camundongos foram sacrificados para avaliação da migração de neutrófilos. Foi realizado o lavado intraarticular com 2 x (5µL) de PBS contendo EDTA (1 mM) e, em seguida, a partir do lavado articular (fêmur-tibial), foram feitas as contagens totais e diferenciais dos leucócitos.

- **Contagem total dos leucócitos** - Alíquotas de 10 µL do lavado articular foram diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:1, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual. O resultado foi expresso como o número de células x 10<sup>4</sup>/cavidade articular.
- **Contagem diferencial dos leucócitos** - As lâminas para contagem diferencial foram preparadas após citocentrifugação (Citospin; Shandon Lipshaw Inc, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) de uma alíquota do lavado intra-articular. Após a centrifugação, foi feito esfregaço sobre a lâmina, o qual foi corado com corante panótico rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil). As células foram examinadas em microscópio

óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos. A quantificação de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi calculada pela porcentagem dessas células contadas nos esfregaços em relação à quantidade total de células (obtida na contagem total). Os resultados foram expressos como número de neutrófilos  $\times 10^4$ /cavidade.

#### **3.4.2.1. Nocicepção e migração de neutrófilos para a cavidade articular induzida por mBSA em animais imunizados e “deficientes” para NOD1, NOD2, RIPK2 e Caspase-1**

Os animais deficientes para NOD1, NOD2, RIPK2 e Caspase-1, e suas respectivas linhagens selvagens, foram imunizados e desafiados com mBSA, conforme descrito anteriormente. Seis horas após o desafio (mBSA; 30  $\mu$ g/cavidade; i.a.) os animais foram submetidos a avaliação da hipernocicepção mecânica e, logo após, o lavado articular foi coletado e a migração dos neutrófilos determinada, sendo também avaliada em camundongos sham-imunizados (SI) e desafiados com mBSA e em camundongos imunizados e desafiados com PBS (grupo-controle). O lavado articular foi coletado também 24 h após o desafio com a mBSA (10  $\mu$ g/cavidade; i.p.) e, em seguida, a migração dos neutrófilos foi determinada nas amostras do lavado, sendo também avaliada em camundongos sham-imunizados (SI) e desafiados com mBSA e em camundongos imunizados e desafiados com PBS (grupo-controle).

### 3.4.3. Efeito do tratamento com IL-1ra sobre o recrutamento de neutrófilos e nocicepção induzido por mBSA em camundongos imunizados

Os animais imunizados foram pré-tratados com o veículo (PBS; 0,1 mL; i.v.) ou IL-1ra (10 mg/kg; i.v.) 30 min. antes do desafio com mBSA. Seis horas após o desafio (mBSA; 30 µg/cavidade; i.a.) os animais foram submetidos à avaliação da hipernocicepção mecânica e, logo após, o lavado articular foi coletado e a migração dos neutrófilos determinada, sendo também avaliada em camundongos sham-imunizados (SI) e desafiados com mBSA e em camundongos imunizados e desafiados com PBS (grupo-controle).

### 3.4.4. Extração de RNA e Real-Time RT-PCR

A extração do RNA total foi realizada utilizando as recomendações do fabricante do reagente Trizol (Gibco BRL), como descrito a seguir: células mononucleares do sangue periférico ou células totais do líquido sinovial de pacientes com AR ou AO (cf.: **tabela 1**) foram utilizadas ( $4 \times 10^6$  células). Para os camundongos foram coletadas as sinóvias: camundongos desafiados foram sacrificados 3 h após desafio com PBS (controle) ou mBSA (30 µg/cavidade). Todas as amostras foram homogeneizadas em Trizol (1 mL) durante 10 min. à temperatura ambiente. A seguir, 200 µL de clorofórmio (Gibco BRL) foram adicionados à suspensão, a qual foi centrifugada a 13.000G por 15 min. à 4°C. A fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo. A esse tubo foi adicionado isopropanol na proporção de 1:1 e, após agitado em Vortex, incubou-se por 15 min. à -20°C,

para precipitação do RNA disperso na fase aquosa. Após incubação e centrifugação a 13.000G durante 15 min. à 4°C, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi suspenso em etanol PA, agitado em Vortex e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi, então, novamente descartado e o precipitado re-suspenso em água livre de RNase. A concentração de RNA foi determinada pela densidade ótica no comprimento de onda de 260 nm, por meio do aparelho GeneQuant (Amersham Biosciences Corp., Piscataway). Um micrograma do RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa Pre-Improm II (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A reação do Real-Time RT-PCR quantitativo foi feita no ABI Prism 7500 Sequence Detection System usando o sistema de fluorescência SYBR-green (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação das amplificações. O RT-PCR foi executado com volume final da reação de 20 µL e mantido sobre 95°C (10 min.), e mais 40 ciclos de 94°C (1 min), 56°C (1 min) e 72°C (2 min). A curva de fusão foi analisada (65–95°C) para verificar se apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “cycle threshold” (CT). Os pares de primers utilizados estão contidos na **Tabela 2** (Anexos).

#### **3.4.5. Ensaio de quantificação de proteoglicano**

Para o ensaio de proteoglicanas, os animais foram desafiados duas vezes (mBSA; 30 µg/cavidade; i.a.) com intervalo de 7 dias entre cada desafio. Sete dias após o último desafio a quantidade de proteoglicano foi determinada utilizando o método descrito por Burkhardt *et al.* com modificações (BURKHARDT; HWA;



GHOSH, 2001). Em resumo, a patella de cada animal foi coletada e fixada em formaldeído (4%) overnight usando um agitador. Depois elas foram transferidas para tubos, separadamente, que continham uma solução de ácido fórmico (5%) e incubadas por 4 h para o processo de descalcificação, com o auxílio de um agitador. Após essa etapa, cada patella foi colocada em um tubo que continha 100  $\mu$ L do tampão de digestão com papaína, que consiste numa suspensão de papaína (5 mg/mL; Sigma P-3125) por mililitro de tampão fosfato livre de cálcio e magnésio, contendo uma concentração de 5 mM de cisteína (Sigma, St Louis, MO) e 10 mM de EDTA, pH 7.4. Então, os tubos foram fechados e lacrados com auxílio de parafilme e incubados em banho maria a 60°C por 16 h. Após os tubos alcançarem a temperatura ambiente, eles foram centrifugados por 10 min. a 1000 **g** para que as gotículas condensadas também fossem coletadas. 50  $\mu$ L de cada sobrenadante e uma série de soluções de sulfato de condroitina (curva padrão; 50-1000  $\mu$ g/ml) foram colocados em placa de 96 poços. As soluções padrões de condroitina também foram incubadas com o tampão de digestão de papaína. Depois, usando uma pipeta multi-canal, foi adicionado 300  $\mu$ L de solução de 1,9-Dimetil-Metilene Azul (DMMB; 50 mg/L; Sigma 341088) em cada poço e a absorbância em 525 nm foi medida em um leitor de placas imediatamente após adicionar o DMMB. O conteúdo de GAG foi calculado a partir da curva padrão construído com o auxílio do *software* do leitor de placas (Softmax®, Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA, U.S.A.). A solução de DMMB foi preparada a partir da dissolução de 50 mg do DMMB em 5 mL de etanol e subsequentemente diluído para um volume de 1000 mL com 0.2% (w/v) tampão formato de sódio, pH 3,5.

### 3.4.6. Análise histológica

Para a análise histológica, os animais foram desafiados duas vezes (mBSA; 30 µg/cavidade; i.a.) com intervalo de sete dias entre cada desafio, e sete dias após o último desafio a articulação fêmur-tibial foi coletada e devidamente dissecada. Primeiramente, preparamos uma solução 0,2M de lisina-HCL com fosfato de sódio dibásico 0,1M e ajustamos para pH 7,4. No passo seguinte, diluímos essa solução para lisina 0,1M com tampão fosfato 0,1M e pH 7,4. Somente no momento do uso, misturamos três partes da solução de lisina com uma parte de solução de paraformaldeído (8%) e, a essa última solução, adicionamos o periodato de sódio (concentrações finais: paraformaldeído 2%, lisina 0,075M e periodato de sódio 0,01M). Deixamos as articulações imersas nesta solução final, apenas uma por frasco (âmbar), e fixamos o tecido a 4°C “overnight”.

Na segunda parte do experimento, lavamos os tecidos por 12h em PBS 0,01M com glicerol em concentrações crescentes 5%, 10% e 15%. Então, deixamos o tecido descalcificando em EDTA-G (Solução de EDTA-G: 11,2g de EDTA, 1,25g NaOH e 15mL de glycerol. Ajustar pH para 7,3 e completar volume para 100 mL) a 4°C pelo período de 10 a 14 dias. Após passado o período de descalcificação, lavamos as amostras durante 12h em passagens sucessivas de: 1) 15% sacarose + 15% glicerol; 2) 20% sacarose + 10% glicerol; 3) 20% sacarose + 5% glicerol; 4) 20% sacarose; 5) 10% sacarose, e; 6) 5% sacarose. Após as lavagens, deixamos em PBS “overnight”. No dia seguinte, prosseguimos com a inclusão e processamento. As secções do tecido (7 µm) serão coloridas com O-Safranina para verificação de perda de proteoglicanas e consequente dano da cartilagem.

### 3.4.7. ELISA (*'enzyme-linked immunosorbent assay'*)

As concentrações de IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC [CXCL-1], assim como a titulação de IgG anti-mBSA, foram determinadas por ELISA (*'enzyme-linked immunosorbent assay'*).

Os camundongos foram sacrificados 3 e 12 h após o desafio para a quantificação de IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC [CXCL-1]. Para tal, foi coletada a articulação fêmur-tibial e triturada com o auxílio de polytron em 300  $\mu$ L de PBS contendo EDTA (1 mM) e centrifugado por 10 min. a 600G. O sobrenadante foi coletado e as dosagens de IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC [CXCL-1] foram determinadas por meio de análise imunoenzimática (ELISA), descrita a seguir: placas de microtitulação (96 poços) foram preenchidas (50  $\mu$ L / poço) com anticorpos específicos anti-TNF- $\alpha$  (2  $\mu$ g/mL) ou anti-KC [CXCL-1] (1  $\mu$ g/mL), os quais haviam sido diluídos em solução-tampão de ligação (*binding buffer*), pH 9.0, e incubados pelo período de 18 a 24 h a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween-20 (0.05%; Sigma) e incubadas por 2 h, em temperatura ambiente, com 100  $\mu$ L de uma solução contendo 1% de albumina bovina, com o intuito de evitar ligações não específicas. Em seguida, as amostras e a curva-padrão (contendo TNF- $\alpha$  e KC [CXCL-1] em várias diluições) foram adicionadas às placas (50  $\mu$ L) e incubadas por 18-24 h a 4°C. Após esse período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com 50  $\mu$ L dos anticorpos policlonais biotinilados específicos para TNF- $\alpha$  (0,2  $\mu$ g/mL) e para KC [CXCL-1] (0,1  $\mu$ g/mL) durante 1 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e, após adição em cada poço de conjugado avidina-HRP diluído 1:5000, incubadas por 30 min.. Uma última lavagem das placas foi realizada e 50  $\mu$ L do substrato dihidroclorato de 1,2-fenilenodiamina

(OPD, sol 0,4 mg OPD – 0,4  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  – 1mL tampão) foi adicionado. Após 15 min., a reação foi interrompida com 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 M) e a densidade óptica (DO) medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em pg/mL de TNF- $\alpha$  ou KC [CXCL-1], com base na curva padrão para cada quimiocina.

A determinação da presença de anticorpos (IgG) anti-mBSA no soro de camundongos imunizados foi obtida a partir do seguinte protocolo: placas de 96 poços (Nunc) foram cobertas (100  $\mu\text{L}$  / poço) com uma solução de mBSA (30  $\mu\text{g}$  / mL) durante 12 h a 4°C. Ao fim deste período, as placas foram lavadas e incubadas com as amostras de soro nas diferentes diluições por 24 h a 4°C. Em seguida, adicionou-se um anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo conjugado a uma fosfatase alcalina (2  $\mu\text{g}$  / mL) e deixou-se as amostras em descanso durante 1 h à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi adicionado o reagente colorimétrico pNPP e, após 15 min., interrompeu-se a reação com 1 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para determinação da densidade óptica (DO) a 405 nm.

#### **3.4.8. Citometria de Fluxo para quantificação da ativação de caspase-FLICA**

Células mononucleares ( $5 \times 10^5$ ) do sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide ou de pacientes com osteoartrite foram cultivadas em placas de 24 cm e estimuladas por 12 h na presença de RPMI, FK156 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou MDP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após a estimulação, as células foram incubadas com a sonda fluorescente FAM-YVAD Caspase-1 FLICA (Immunochemistry Technologies) em estufa 37°C a 5%  $\text{CO}_2$  durante 1h. Após a incubação as células foram lavadas sob centrifugação (5 repetições de 5 min. cada) em PBS 3% SBF. Finalmente, as células foram

suspensas em 100  $\mu$ L de PBS e as amostras foram adquiridas no aparelho FACS<sup>TM</sup> (Becton & Dickinson) e analisadas através do programa Flow Jo.

#### **3.4.9. Ensaio de proliferação celular**

As células provenientes dos linfonodos drenantes foram cultivadas na presença de [<sup>3</sup>H]timidina. Isso permitiu constatar a ocorrência de proliferação celular "in vitro", através da análise da incorporação da [<sup>3</sup>H]timidina ao DNA da célula. O experimento foi realizado em placas de 96 poços, no interior dos quais foram cultivadas  $5 \times 10^4$  células. As células foram mantidas por três dias em RPMI completo na presença de ConA, mBSA ou meio. Vinte e quatro horas antes do final do experimento, adicionou-se 10mCi/mL de [<sup>3</sup>H]timidina ao meio de cultura. Após precipitação com ácido tricloroacético, promoveu-se a leitura em líquido de cintilação.

#### **3.4.10. Artrite induzida por colágeno**

Animais DBA-1/J receberam uma injeção intradérmica na base da cauda de 100  $\mu$ g de colágeno do tipo II bovino emulsificados em 0,1ml de PBS/adjuvante completo de Freund (4 mg/mL). Os camundongos controle sham-imunizados receberam o mesmo tratamento, porém sem administração de colágeno. Os camundongos foram monitorados diariamente no intuito de avaliarmos os sinais de desenvolvimento da artrite experimental e os escores clínicos foram aplicados de acordo com o que segue: normal = 0; eritema = 1; eritema + inchaço = 2; perda de

função = 3; e soma dos quatro membros = escore total. O desenvolvimento da doença caracterizado por eritema ou inchaço das patas foi observado a partir do 11º dia nos animais que receberam tratamento com MDP (i.p.) e a partir do 23º dia nos animais imunizados não-tratados.

### **3.5. Análise estatística dos resultados**

Nos casos de diferentes tratamentos, o teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar os resultados. Em todos os casos, comparações individuais foram pós-testadas com teste t de Bonferroni (comparações múltiplas) ou teste t de Student (comparação entre duas amostras) para amostras não-pareadas. O número (n) de animais por grupo experimental está descrito nas legendas. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de  $P < 0.05$ .

## ***Resultados***

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Expressão dos receptores NOD1 e NOD2

Para investigar a relevância clínica do NOD1 e do NOD2 no processo da artrite avaliamos a expressão desses receptores em células mononucleares purificadas do sangue periférico e em células totais do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite (**Tabela 1**). Nossos resultados demonstram que células mononucleares do sangue periférico e células totais do líquido sinovial de pacientes com AR apresentam maior expressão do mRNA de NOD2, porém não de NOD1, quando comparados com pacientes com OA (**Figura 9, A – D**).

### 4.2. NOD2, mas não NOD1, está envolvido na artrite induzida por antígeno

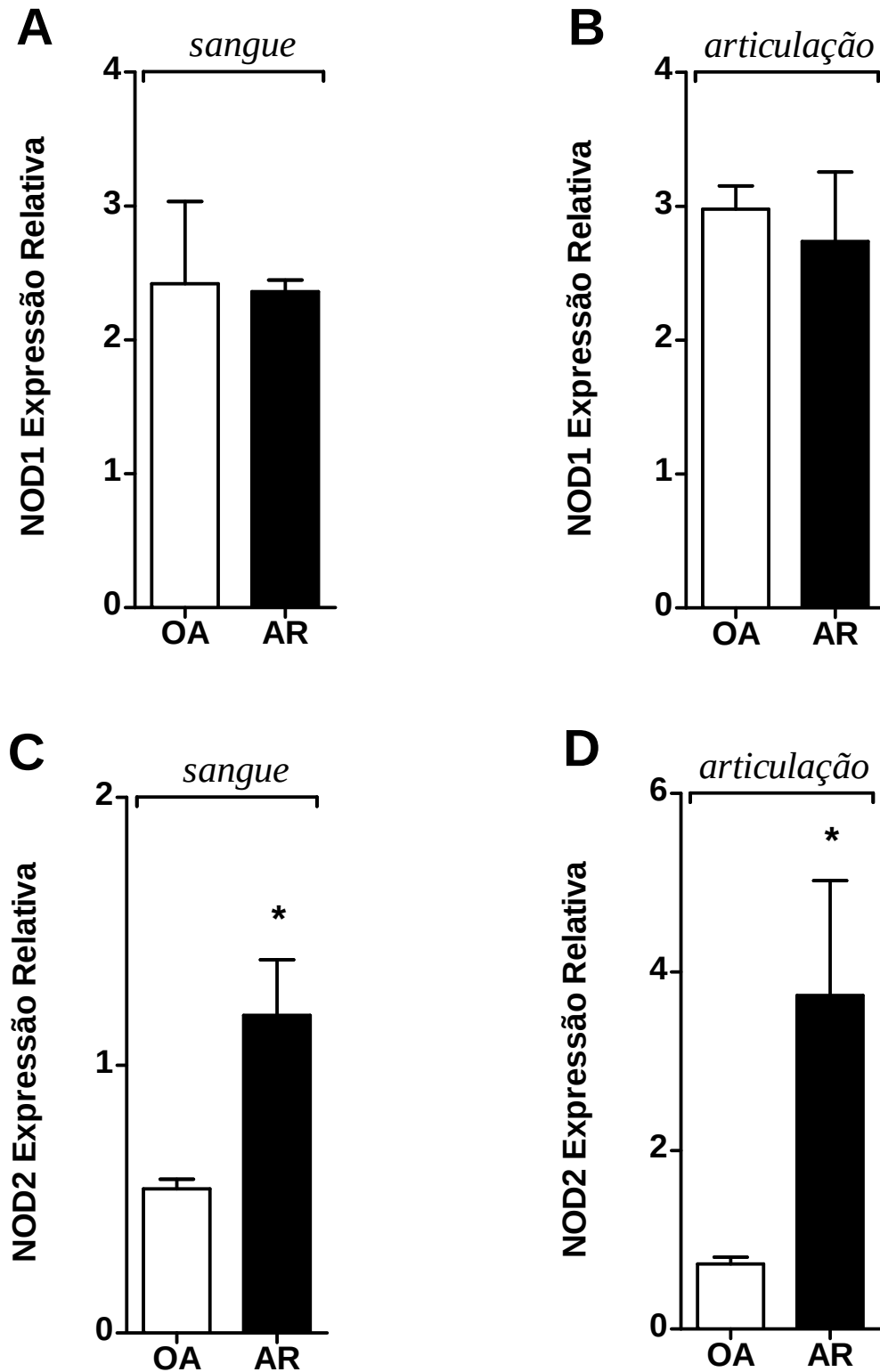
Para averiguar a importância do NOD1 e do NOD2 no processo da artrite induzida por antígeno camundongos selvagens foram imunizados e desafiados conforme descrito anteriormente. Camundongos naïve também receberam injeção intra-articular de mBSA. A membrana sinovial dos camundongos foi coletada 3 horas após o desafio para avaliação da expressão dos receptores NOD1 e NOD2. Nossos resultados mostram que apenas o mRNA de NOD2 aumenta após o desafio com mBSA na membrana de animais imunizados (**Figura 10**).



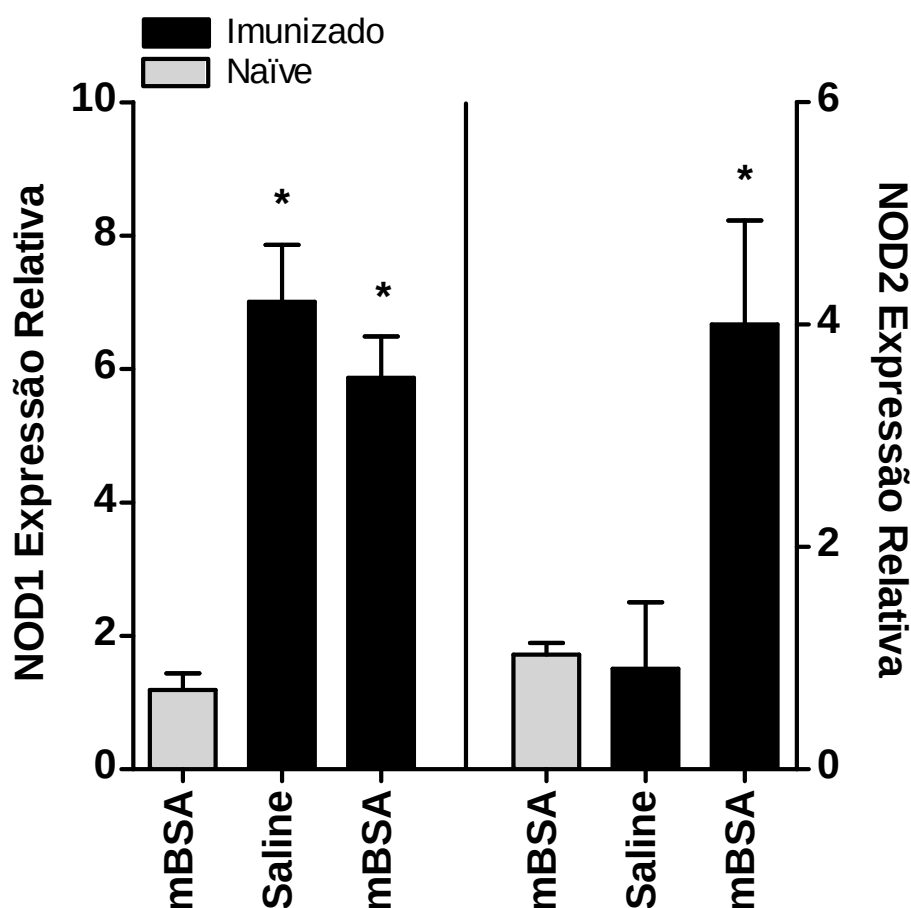
**Tabela 1.** Características clínicas e demográficas de pacientes com osteoartrite (OA) e artrite reumatóide (AR) tratados com metotrexato (MTX) ou metotrexato mais infliximabe.

| Características clínicas                  | Pacientes AR   |                              | Pacientes OA<br>(n = 4) |
|-------------------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------------|
|                                           | MTX<br>(n = 4) | MTX +<br>anti-TNF<br>(n = 9) |                         |
| Idade (anos $\pm$ SEM)                    | 51 $\pm$ 4.6   | 44.5 $\pm$ 4.9               | 53.9 $\pm$ 4.2          |
| Mulheres (%)                              | 4 (100 %)      | 7 (77 %)                     | 2 (50 %)                |
| Caucasianos (%)                           | 4 (100 %)      | 9 (100 %)                    | 3 (75 %)                |
| RF-positivo (%)                           | 3 (75 %)       | 6 (66 %)                     | 0 (0 %)                 |
| Anti-CCP positivo (%)                     | 2 (50 %)       | 6 (66 %)                     | 0 (0 %)                 |
| Média duração doença (anos $\pm$ SEM)     | 3.5 $\pm$ 1.4  | 8.2 $\pm$ 2.38               | N/A                     |
| MTX dose (mg/week)                        | 16.9           | 17.2                         | -                       |
| MTX (meses uso – média $\pm$ SEM)         | 13 $\pm$ 1.9   | 22.6 $\pm$ 1.3               | -                       |
| Infliximabe dose (mg/kg/dose)             | -              | 4                            | -                       |
| Infliximabe (meses uso – média $\pm$ SEM) | -              | 9.6 $\pm$ 0.8                | -                       |
| DAS-28 (média $\pm$ SEM)                  | 5.1 $\pm$ 0.3  | 3.8 $\pm$ 0.5                | -                       |

RF = Fator Reumatóide; Anti-CCP=anticorpos anti-cíclico citrulinados; MTX = metotrexato; DAS = Escore de Atividade da Doença; N/A = Não-Aplicável.



**Figura 9.** Expressão de NOD1 e NOD2 nas células mononucleares do sangue periférico ou leucócitos totais do líquido sinovial de pacientes com AR ou OA. Expressão do mRNA de NOD1 ou NOD2 em amostras de pacientes com AR ou OA expressa em relação ao gene da GAPDH ( $2^{-\text{delta valor Ct}} \times 1.000$ ). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



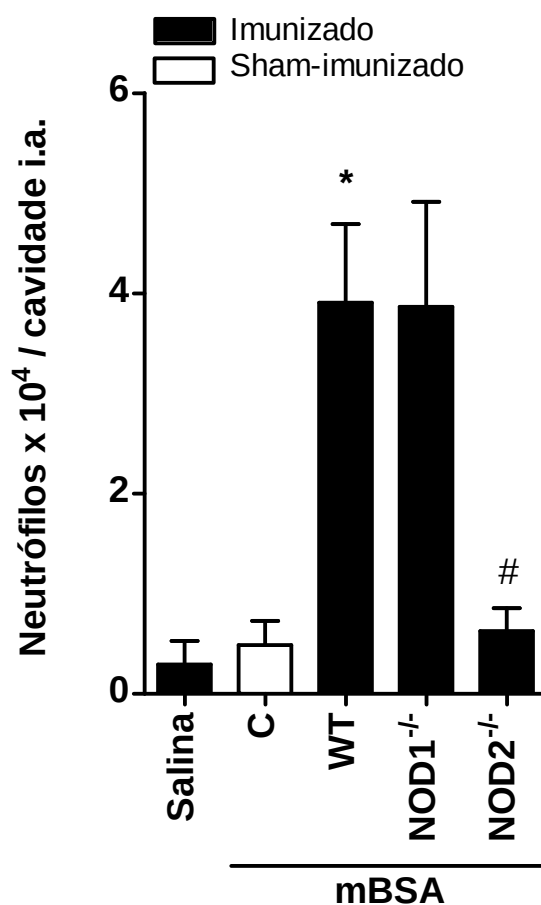
**Figura 10. Expressão de NOD1 e NOD2 na membrana sinovial de camundongos.** Expressão do mRNA de NOD1 ou NOD2 em amostras de membrana sinovial de camundongos selvagens expressa em relação ao gene da  $\beta$ -actina ( $2^{-\text{delta valor Ct}} \times 1.000$ ). As membranas sinoviais foram coletadas 3 horas após injeção i.a. de salina (controle) ou o mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) em camundongos selvagens naïve ou imunizados. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

#### **4.3. Os parâmetros inflamatórios estão reduzidos no *NOD2*<sup>-/-</sup>, mas não *NOD1*<sup>-/-</sup>**

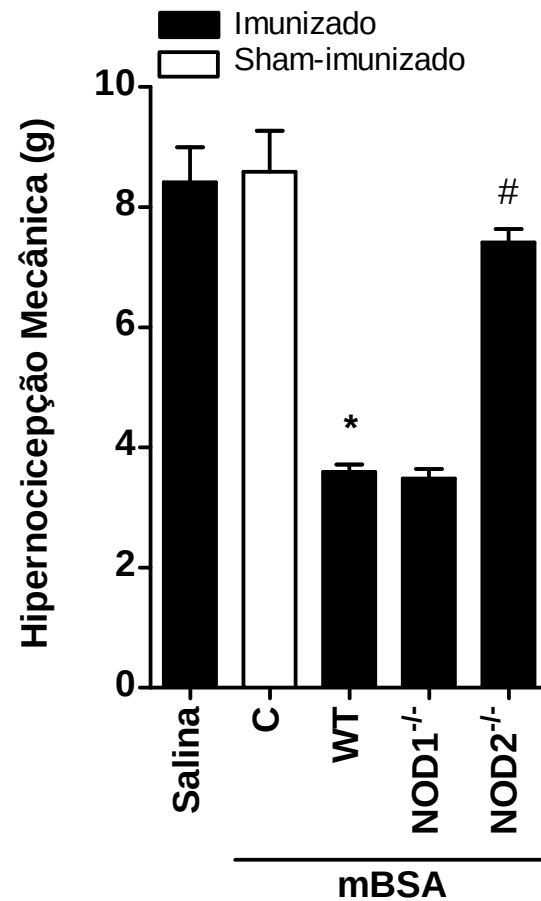
A artrite induzida por antígeno é caracterizada por uma infiltração precoce maciça de neutrófilos na cavidade articular e também por uma intensa nocicepção mecânica. Neste ponto fomos averiguar a importância do NOD1 e do NOD2 no desenvolvimento dos parâmetros inflamatórios no processo da artrite induzida por antígeno. Camundongos selvagens e deficientes para NOD1 e NOD2 foram imunizados e desafiados conforme descrito. Camundongos selvagens sham-imunizados também receberam injeção intra-articular de mBSA. Observou-se que 6 horas após o desafio com mBSA na articulação dos camundongos *NOD1*<sup>-/-</sup> e selvagens imunizados ocorreu uma infiltração proeminente de neutrófilos (**figura 11**) e hipernocicepção mecânica (**figura 12**). Ambos os eventos não foram observados nos camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados desafiados com mBSA.

#### **4.4. Os camundongos deficientes para NOD2 são protegidos contra lesão**

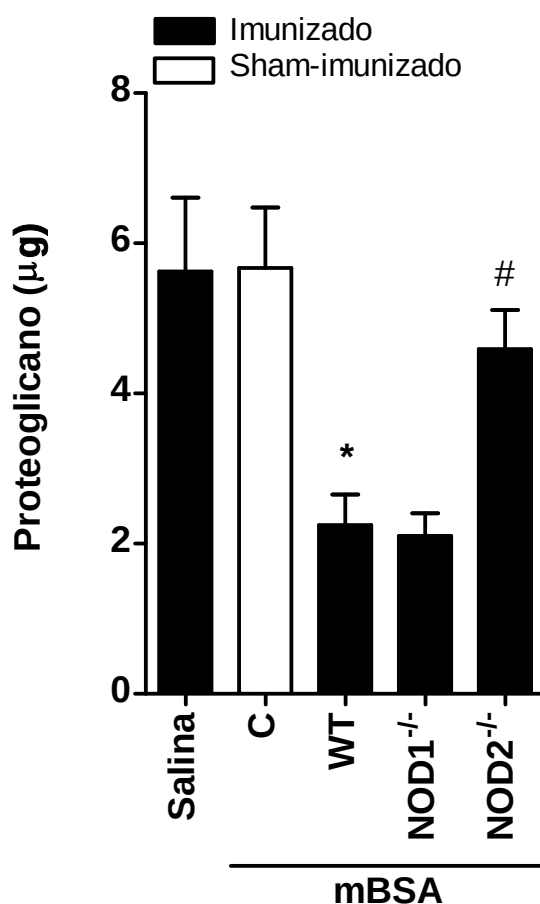
A erosão da cartilagem articular causada pela degradação da matriz extracelular é uma característica da artrite. Assim, avaliamos a erosão da cartilagem na artrite induzida por mBSA a partir da quantificação de proteoglicanas na articulação de camundongos 7 dias após um segundo desafio com o mBSA, conforme descrito anteriormente. Neste conjunto de experimento observou-se que camundongos selvagens e *NOD1*<sup>-/-</sup> tem uma perda significativa nos níveis de proteoglicanas comparados com camundongos controle, e essa redução de proteoglicanas não foi observada em camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> (**figura 13**). Estes resultados podem ser diretamente visualizados por análise histopatológica na coloração de cartilagem por o-safranina (**figura 14**).



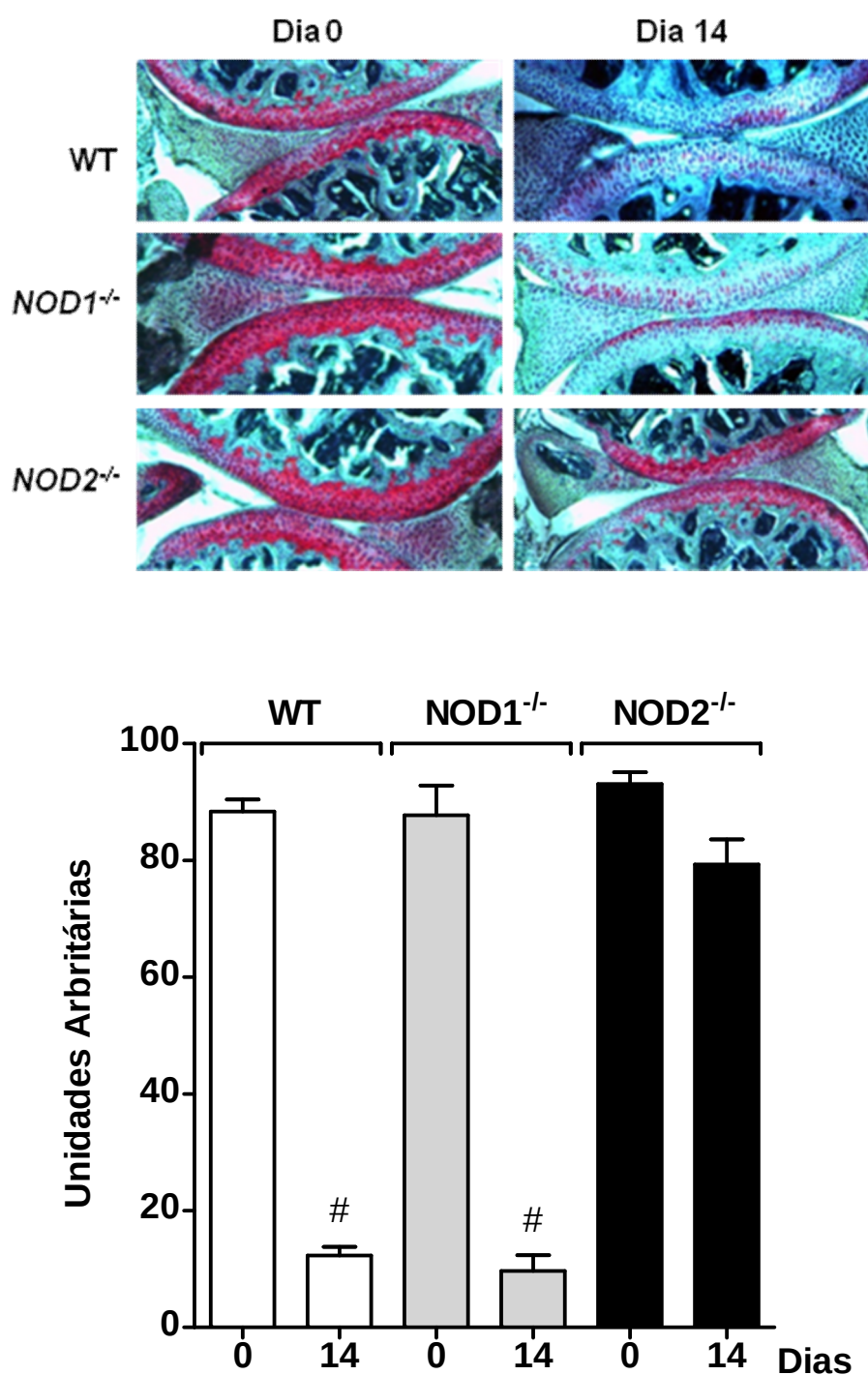
**Figura 11. Migração de neutrófilos.** Camundongos selvagens (WT), *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> imunizados e sham-imunizados foram desafiados com a mBSA (10 µg; i.a.), e 6 horas depois, a migração de neutrófilos foi calculada e comparada com a de camundongos imunizados desafiados com salina (controle). Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 12. Hipernociceção mecânica.** Hipernociceção mecânica induzida por injeção i.a. de mBSA (30  $\mu$ g; i.a.) em camundongos WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados, e 6 horas depois, a resposta hipernociceptiva foi determinada e comparada com os camundongos imunizados desafiados com salina (controle). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 13. Avaliação de lesão articular.** Estimativa da perda de proteoglicanas induzida por injeção i.a. de mBSA (30 µg; i.a.) em camundongos WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados. Os camundongos imunizados desafiados com salina foram utilizados como controle. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 14. Avaliação de lesão articular.** Análise histológica da cartilagem articular em camundongos WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> imunizados. As articulações do joelho foram submetidas a coloração com O-safranina “fast green staining”. As análises de lesão foram feitas com software ImageJ com base em detecção de colorações por ROI. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



#### **4.5. Camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> apresentam menores níveis de TNF- $\alpha$ e KC/CXCL1**

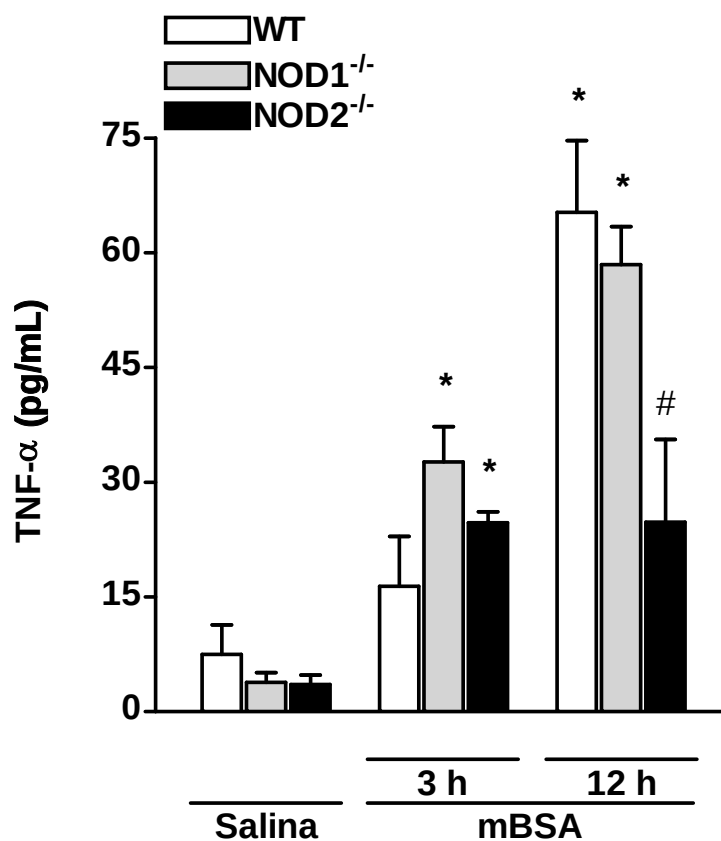
Como os camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> apresentaram redução na migração de neutrófilos e hipernocicepção, bem como menor erosão na cartilagem, resolvemos verificar como estavam os níveis de TNF- $\alpha$  e KC/CXCL1. Camundongos selvagens e deficientes para NOD1 e NOD2 foram imunizados e desafiados conforme descrito. Três e 12 horas após o desafio com mBSA, ou salina, a articulação destes animais foram coletadas e processadas para a dosagem de TNF- $\alpha$  e KC/CXCL1. A redução nos parâmetros inflamatórios em camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> foi associada com uma redução nos níveis da citocina TNF- $\alpha$  (**figura 15**) e da quimiocina KC/CXCL1 (**figura 16**).

#### **4.6. A expressão de RANKL está reduzida em camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup>**

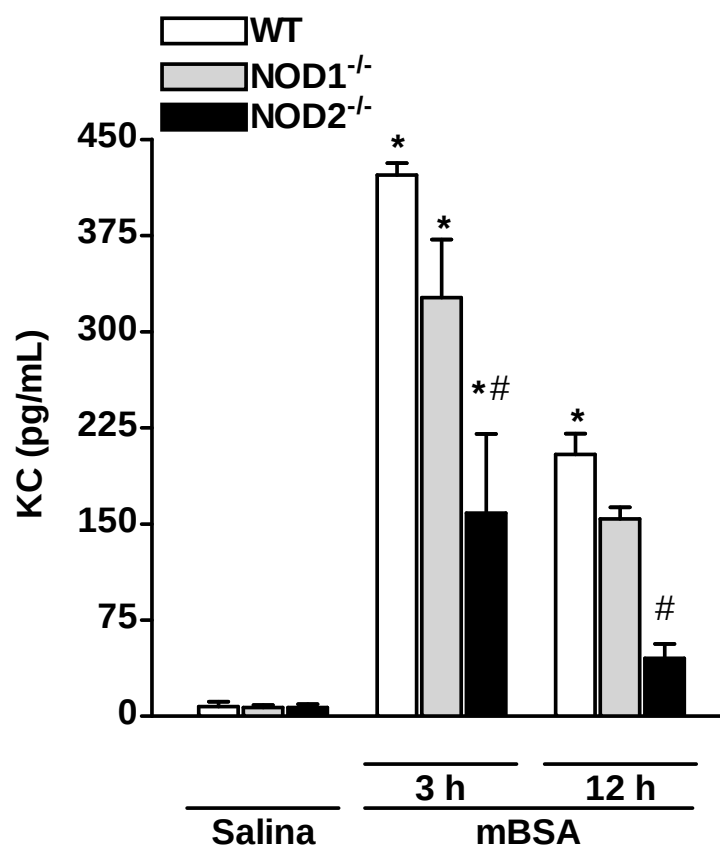
Camundongos selvagens e deficientes para NOD1 e NOD2 foram imunizados e desafiados conforme descrito anteriormente. Camundongos sham-imunizados também receberam injeção intraarticular de mBSA. A articulação foi coletada 12 horas após o desafio para avaliação da expressão de RANKL. Animais *NOD2*<sup>-/-</sup> apresentam menor expressão de RANKL (**figura 17**).

#### **4.7. O MDP antecipa e potencializa a artrite induzida por colágeno**

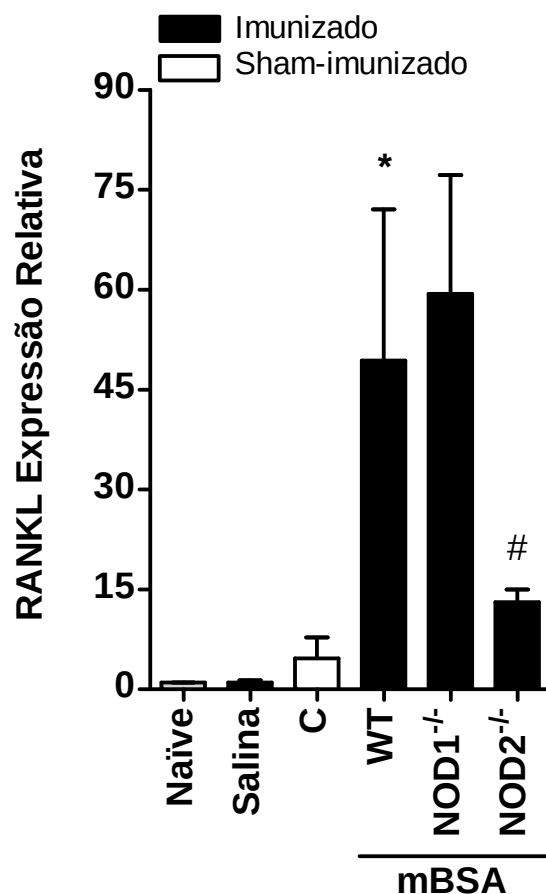
Como o receptor NOD2 parece ser importante para o desenvolvimento da artrite fomos averiguar se o agonista deste receptor poderia induzir uma artrite mais severa. Assim, imunizamos animais DBA/1J, conforme descrito anteriormente, e no 10º dia após a imunização começamos a tratar diariamente um grupo de 6 animais com o MDP (ligante de NOD2; i.p.). O tratamento com MDP foi suspenso no 20º dia. Verificamos que o agonista de NOD2 acelerou e tornou mais potente o processo de desenvolvimento da artrite (**figura 18**).



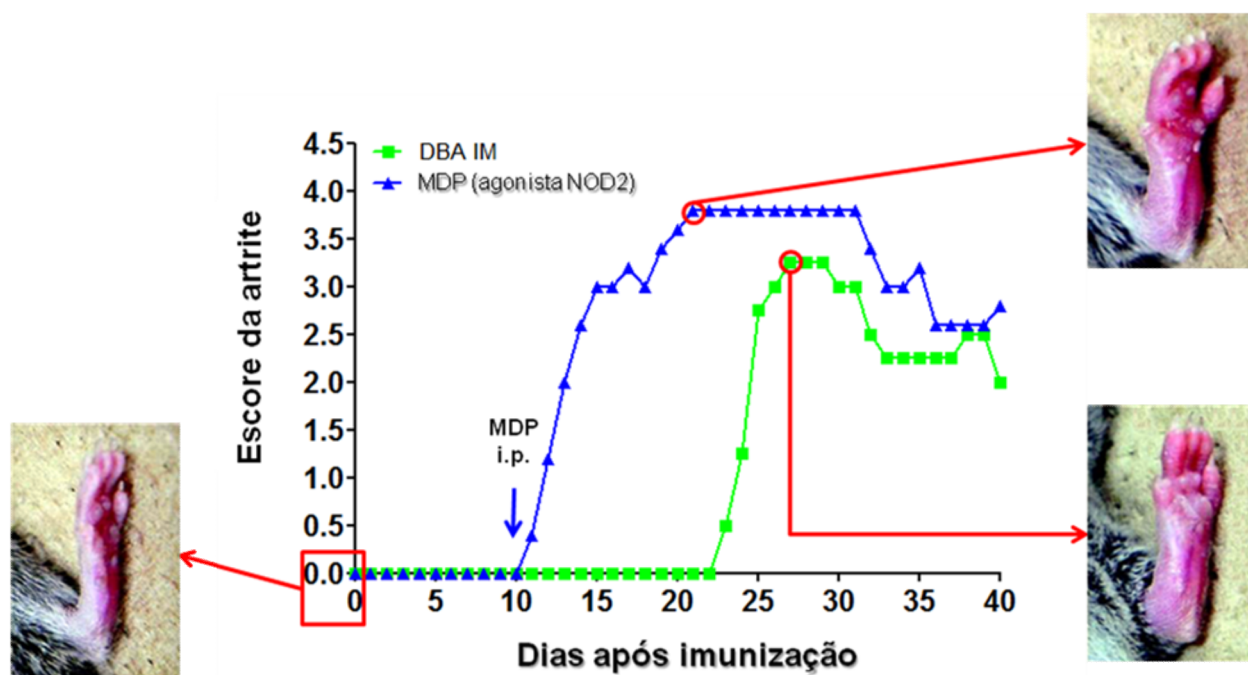
**Figura 15. Influência dos receptores NOD1 e NOD2 sobre a produção de TNF- $\alpha$ .** As concentrações de TNF- $\alpha$  na cavidade articular foram determinados 3 e 12 horas após o desafio com o mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) ou salina em camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P$ <0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 16. Influência dos receptores NOD1 e NOD2 sobre a produção de KC/CXCL1.** As concentrações de KC/CXCL1 na cavidade articular foram determinados 3 e 12 horas após o desafio com o mBSA (10 µg; i.a.) ou salina em camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 17. Influência dos receptores NOD1 e NOD2 sobre a expressão de RANKL.** mRNA do RANKL na articulação foi determinado 12 horas após o desafio com o mBSA (10 µg; i.a.) ou salina em camundongos imunizados e sham-imunizados. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



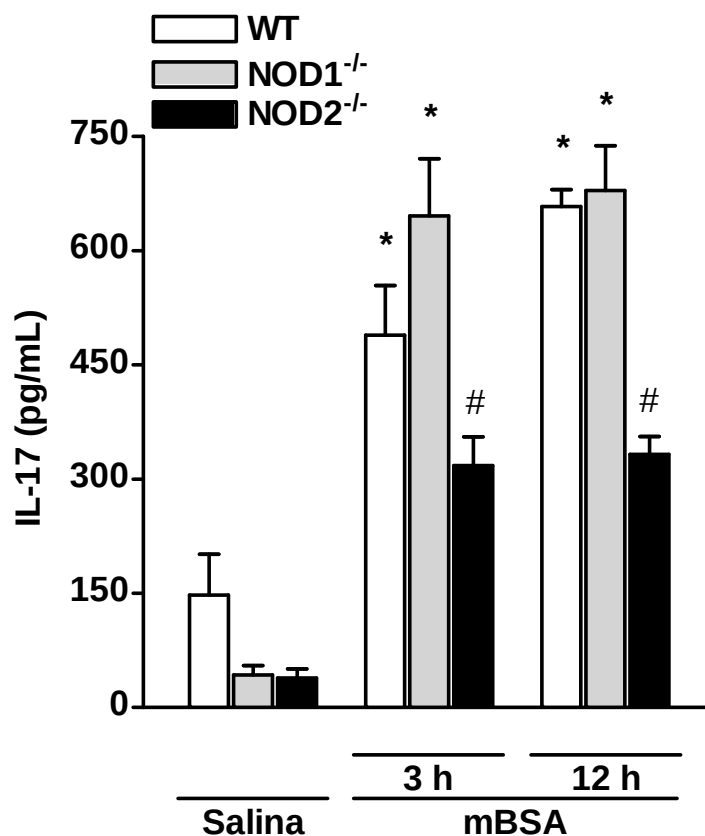
**Figura 18. Ação do agonista NOD2 sobre o desenvolvimento da artrite.** Camundongos DBA/1J foram imunizados com colágeno tipo II. Um grupo de 6 animais receberam injeção intraperitoneal de MDP (100  $\mu$ g; i.p.). O outro grupo composto por 5 animais não foi tratado com MDP. Os animais foram monitorados diariamente.

#### 4.8. Camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> apresentam menores níveis de IL-17 e IL-1 $\beta$

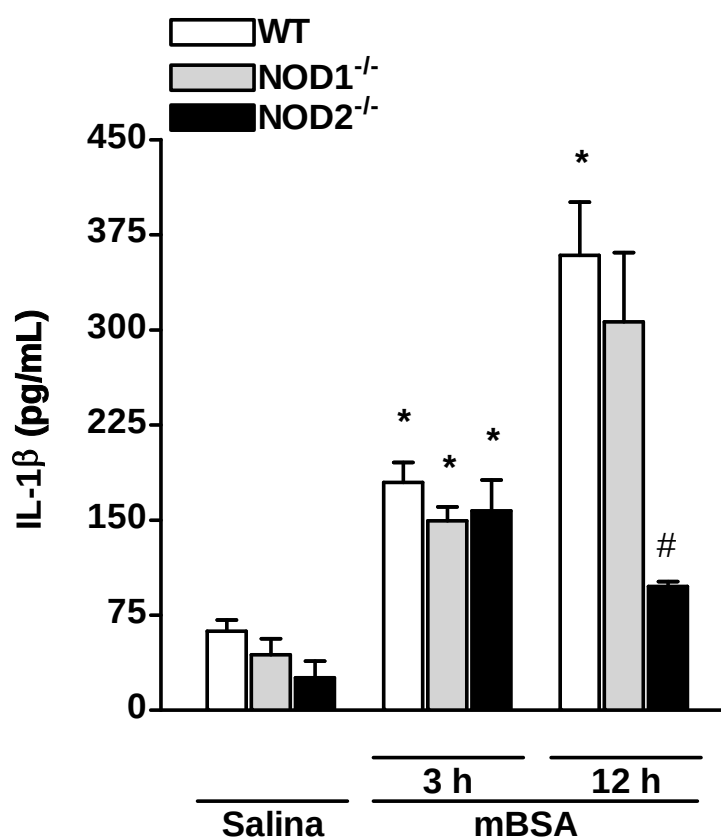
Como os camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> apresentaram redução na migração de neutrófilos e hipernocicepção, bem como menor erosão na cartilagem e redução nos níveis de TNF- $\alpha$  e KC/CXCL1, fomos verificar os níveis de citocinas envolvidas com o padrão de resposta T<sub>H</sub>17, a IL-17 e a IL-1 $\beta$ . Camundongos selvagens e deficientes para NOD1 e NOD2 foram imunizados e desafiados conforme descrito. Três e 12 horas após o desafio com mBSA, ou salina, a articulação destes animais foram coletadas e processadas para a dosagem de IL-17 e IL-1 $\beta$ . A redução nos parâmetros inflamatórios em camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> foi associada com uma redução nos níveis das citocinas IL-17 (**figura 19**) e IL-1 $\beta$  (**figura 20**).

#### 4.9. Citocinas que auxiliam na resposta T<sub>H</sub>17 são moduladas pelo NOD2

Como os camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> apresentaram redução nos níveis de IL-17 e IL-1 $\beta$ , fomos verificar a expressão de citocinas indicadas na literatura como envolvidas com o padrão de resposta T<sub>H</sub>17: o TGF- $\beta$ , a IL-6 e a IL-23. Camundongos selvagens e deficientes para NOD1 e NOD2 foram imunizados e desafiados conforme descrito. Três horas após o desafio com mBSA, ou salina, a membrana sinovial destes animais foram coletadas e processadas para análise da expressão das citocinas em questão por PCR quantitativo em tempo real. A redução nos níveis das citocinas IL-17 e IL-1 $\beta$  corroboraram com uma redução na expressão de IL-6 (**figura 21, B**) e IL-23 (**figura 22**), porém não da TGF- $\beta$  (**figura 21, A**), em camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup>.

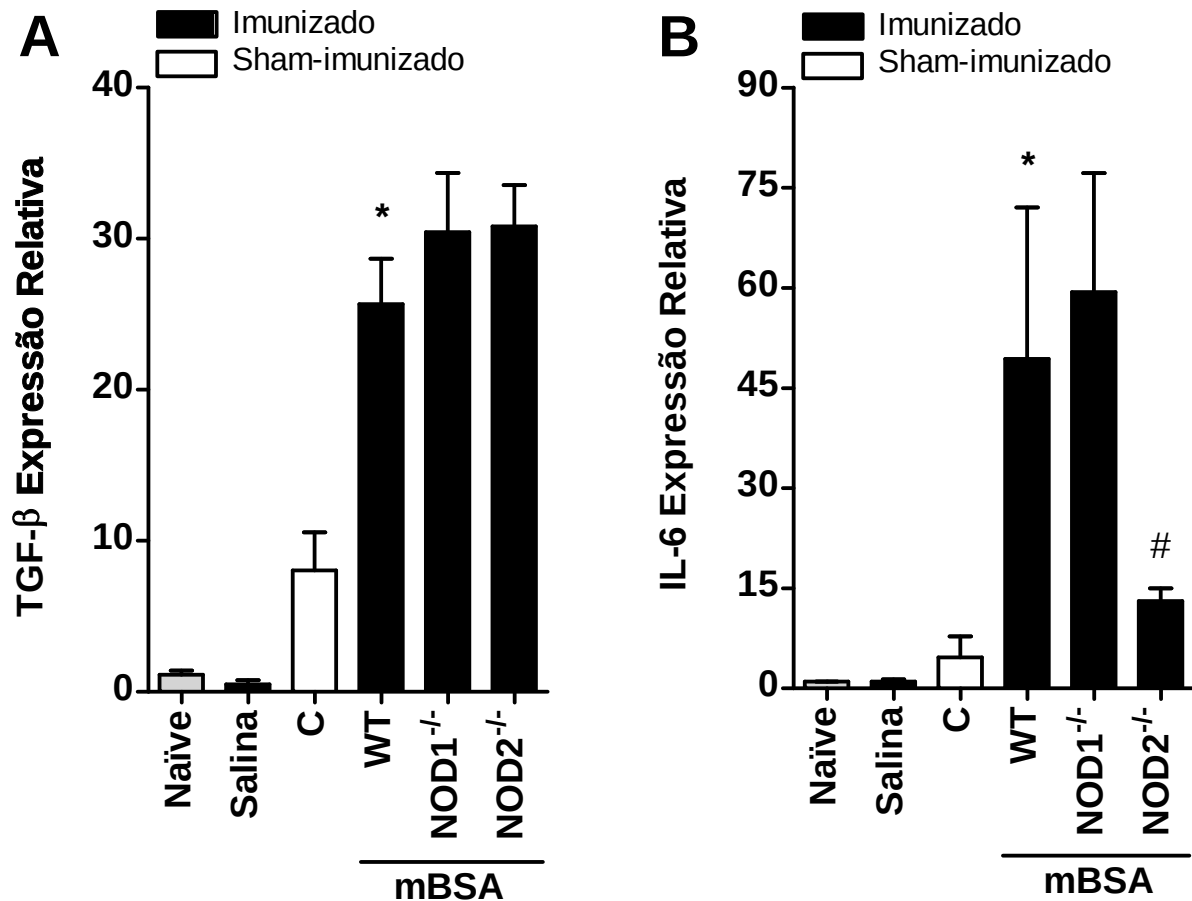


**Figura 19. Influência dos receptores NOD1 e NOD2 sobre a produção de IL-17.** As concentrações de IL-17 na cavidade articular foram determinados 3 e 12 horas após o desafio com o mBSA (10 µg; i.a.) ou salina em camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

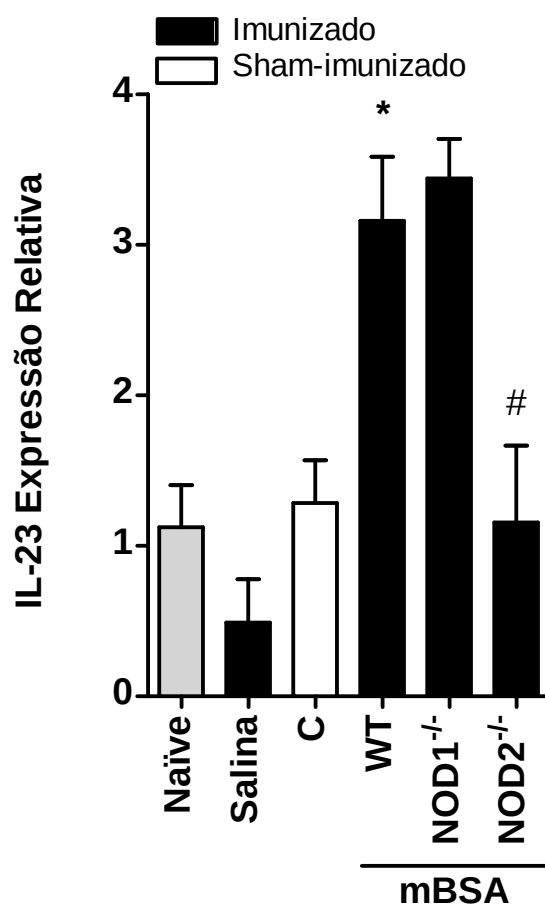


**Figura 20. Influência dos receptores NOD1 e NOD2 sobre a produção de IL-1 $\beta$ .** As concentrações de IL-1 $\beta$  na cavidade articular foram determinados 3 e 12 horas após o desafio com o mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) ou salina em camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P$ <0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).





**Figura 21. Influência dos receptores NOD1 e NOD2 sobre a expressão de citocinas.** mRNA da TGF- $\beta$  (A) e IL-6 (B) na membrana sinovial foram determinados 3 horas após o desafio com o mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) ou salina em camundongos imunizados e sham-imunizados. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P$ <0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



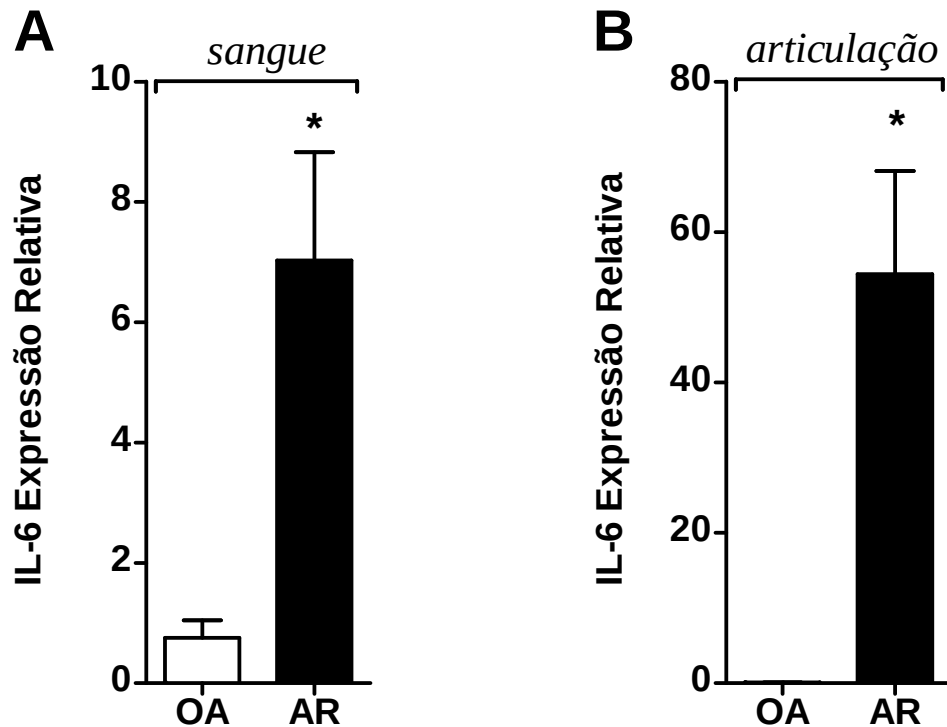
**Figura 22. Influência dos receptores NOD1 e NOD2 sobre a expressão de IL-23.** mRNA da IL-23 na membrana sinovial foram determinados 3 horas após o desafio com o mBSA (10 µg; i.a.) ou salina em camundongos imunizados e sham-imunizados. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.10. A expressão de IL-6

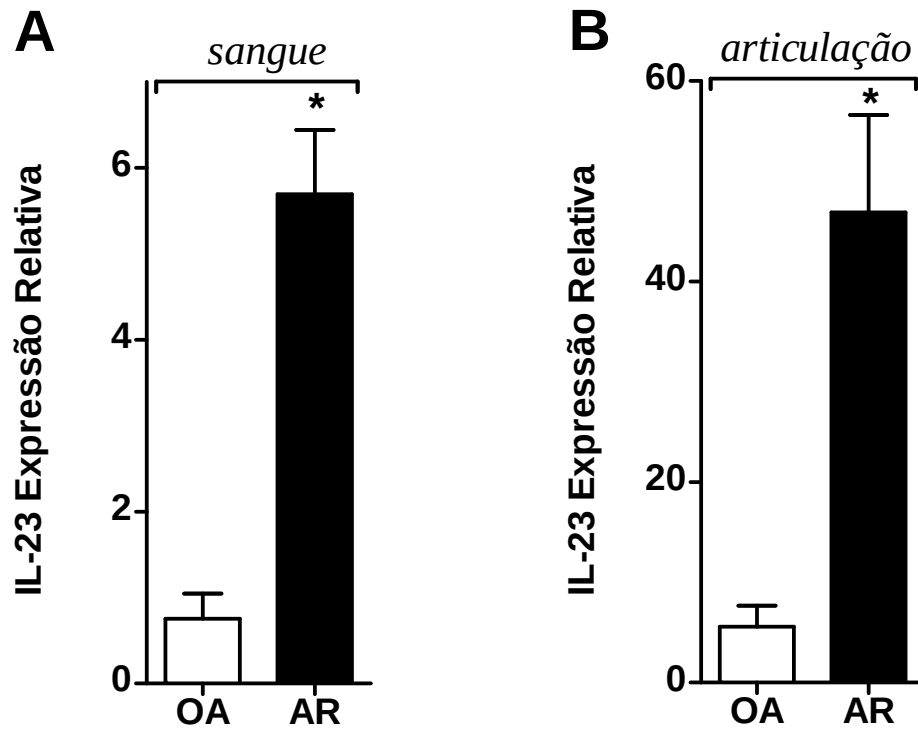
A IL-6 é uma citocina importantíssima para o processo de diferenciação de células  $T_H17$ . Portanto investigamos a relevância clínica da IL-6 no processo da artrite a partir da avaliação da expressão dessa citocina em células mononucleares purificadas do sangue periférico e em células totais do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite (**Tabela 1**). Nossos resultados demonstram que células mononucleares do sangue periférico e células totais do líquido sinovial de pacientes com AR apresentam maior expressão do mRNA de IL-6 em comparação a células de pacientes com OA (**figura 23, A – D**).

#### 4.11. A expressão de IL-23 e IL-1 $\beta$

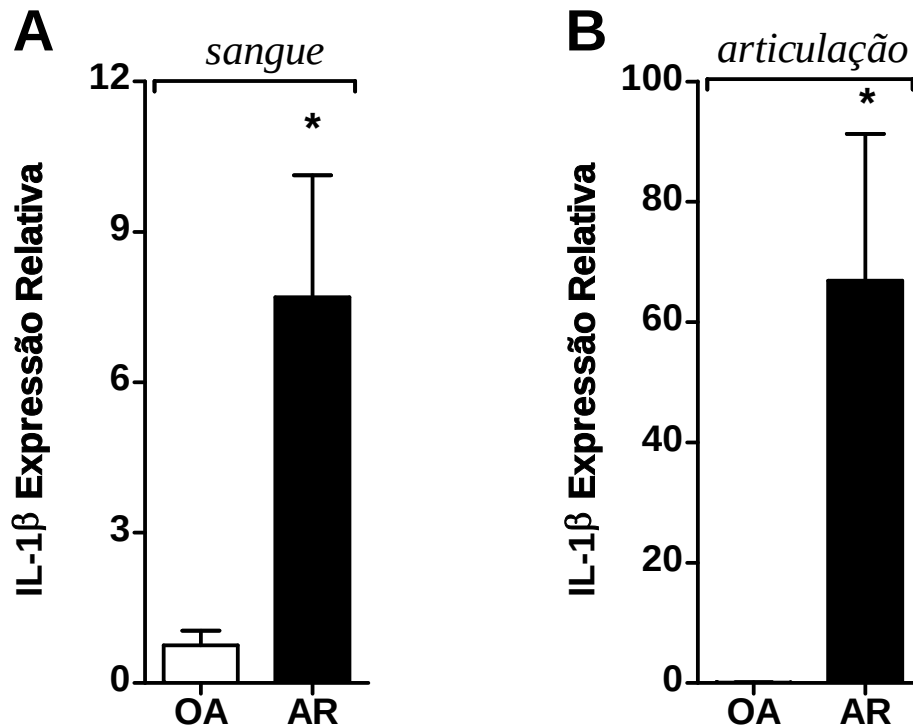
A IL-23 e a IL-1 $\beta$  são citocinas importantíssimas para o processo de diferenciação e manutenção de células  $T_H17$  humanas. Portanto investigamos a relevância clínica da IL-23 e da IL-1 $\beta$  no processo da artrite a partir da avaliação da expressão dessas citocinas em células mononucleares purificadas do sangue periférico e em células totais do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite (**Tabela 1**). Nossos resultados demonstram que células mononucleares do sangue periférico e células totais do líquido sinovial de pacientes com AR apresentam maior expressão do mRNA de IL-23 (**figura 24, A e B**) e IL-1 $\beta$  (**figura 25, A e B**) em comparação a células de pacientes com OA.



**Figura 23.** Expressão de IL-6 nas células mononucleares do sangue periférico ou leucócitos totais do líquido sinovial de pacientes com AR ou OA. Expressão do mRNA de IL-6 em amostras de pacientes com AR ou OA expressa em relação ao gene da GAPDH ( $2^{-\text{delta valor Ct}} \times 1.000$ ). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



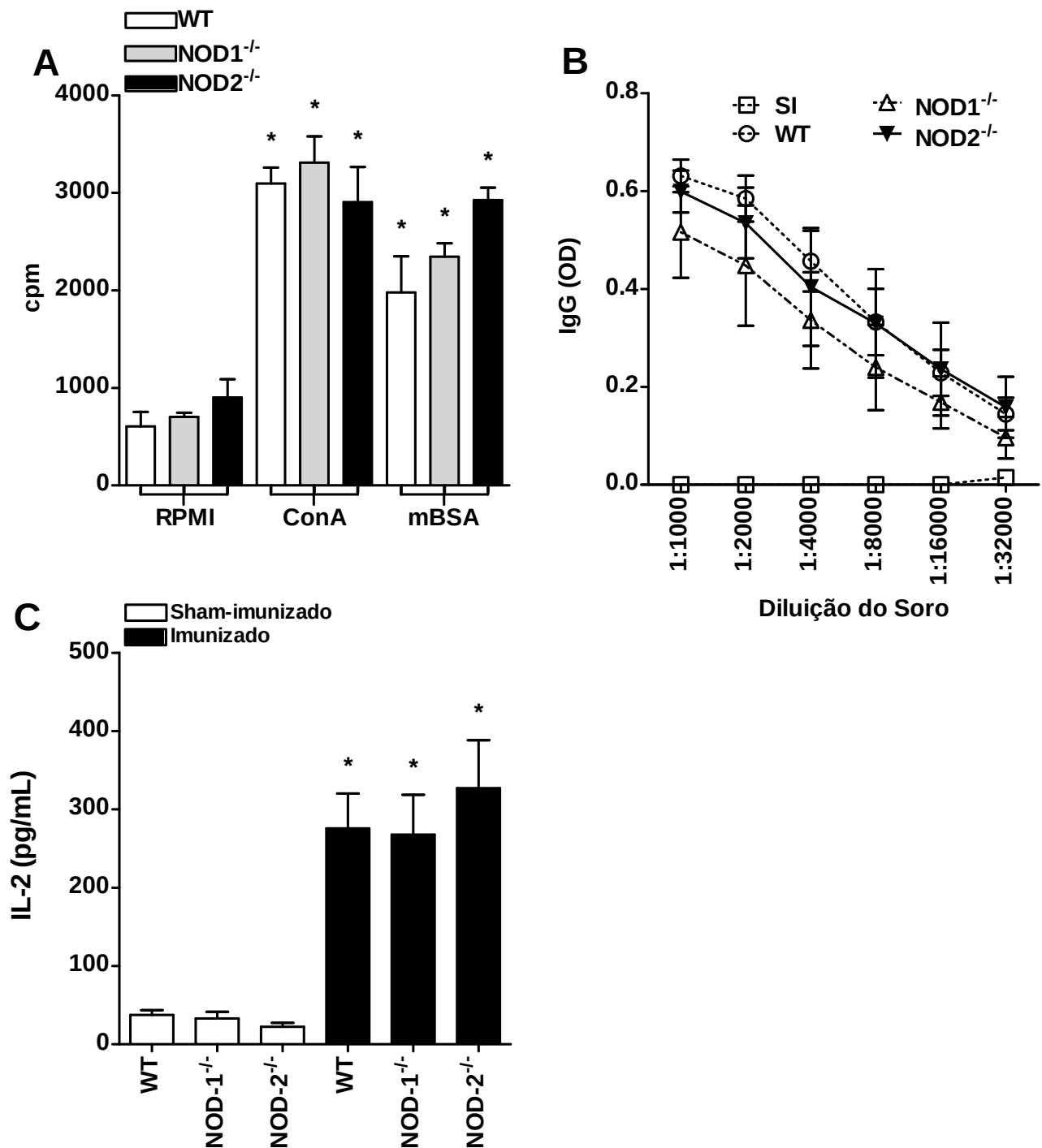
**Figura 24. Expressão de IL-23 nas células mononucleares do sangue periférico ou leucócitos totais do líquido sinovial de pacientes com AR ou OA.** Expressão do mRNA de IL-23 em amostras de pacientes com AR ou OA expressa em relação ao gene da GAPDH ( $2^{-\text{delta valor Ct}} \times 1.000$ ). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 25. Expressão de IL-1 $\beta$  nas células mononucleares do sangue periférico ou leucócitos totais do líquido sinovial de pacientes com AR ou OA.** Expressão do mRNA de IL-1 $\beta$  em amostras de pacientes com AR ou OA expressa em relação ao gene da GAPDH ( $2^{-\text{delta valor Ct}} \times 1.000$ ). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.12. Resposta inflamatória nos camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup>

Para investigar se a redução da resposta inflamatória de camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> foi devido à imunização, nós determinamos: os níveis de anticorpos contra o mBSA no soro de camundongos imunizados; a proliferação celular das células derivadas dos linfonodos pós-estímulo com RPMI, mBSA ou ConA; e, os níveis de IL-2 no sobrenadante das células dos linfonodos estimulados com o mBSA. Observamos que o total de anticorpos IgG anti-MBSA e os níveis de IL-2, bem como a proliferação das células T, foi semelhante entre os camundongos selvagens, *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> (figura 26, A - C).



**Figura 20. Avaliação do processo de imunização.** (A) células de linfonodos de camundongos WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> imunizados foram cultivadas com RPMI, ConA (0,5 mg / ml) ou mBSA (100 mg / ml), e 96 horas depois, a proliferação foi avaliada e comparada com as células incubadas somente com RPMI (controle). (B) Níveis de anticorpos contra mBSA no soro de camundongos WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados (SI). (C) Produção de IL-2 no sobrenadante de células derivadas do linfonodo de camundongos WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> imunizados. As células derivadas do linfonodo ( $5 \times 10^5$ /well) foram estimuladas com o mBSA (100 mg / ml), e após 72 horas os níveis de IL-2 foram determinados por ELISA. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

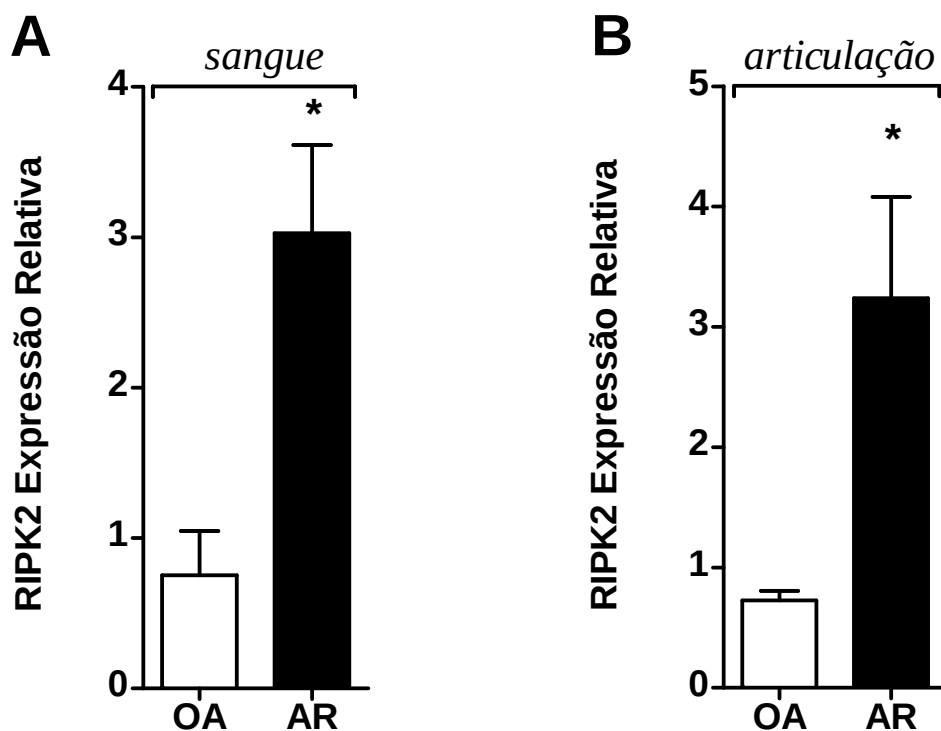


#### 4.13. Expressão da molécula de sinalização RIPK2

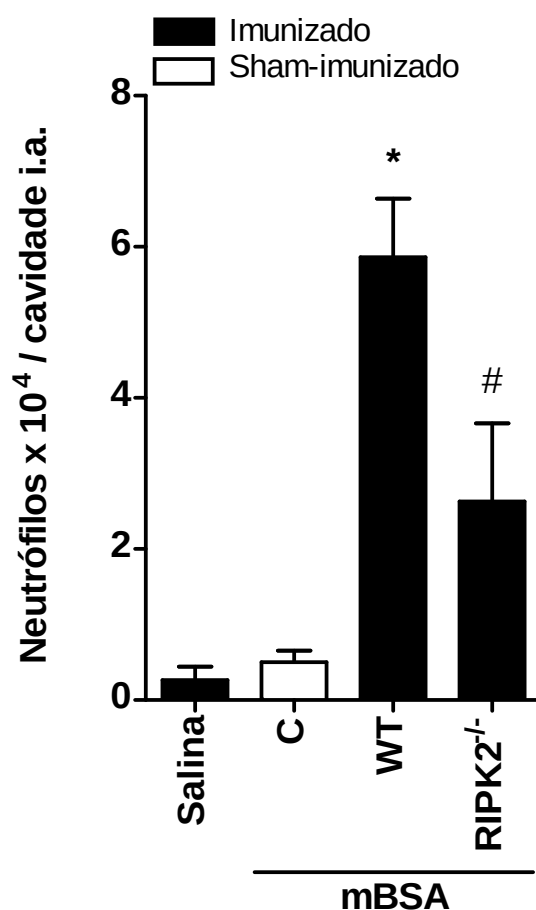
Para investigar a relevância clínica do RIPK2 no processo da artrite avaliamos a expressão dessa molécula em células mononucleares purificadas do sangue periférico e em células totais do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite (**Tabela 1**). Nossos resultados demonstram que células mononucleares do sangue periférico e células totais do líquido sinovial de pacientes com AR apresentam elevada expressão do mRNA de RIPK2 quando comparados com pacientes com OA (**figura 27, A – B**).

#### 4.14. Os parâmetros inflamatórios estão reduzidos no *RIPK2*<sup>-/-</sup>

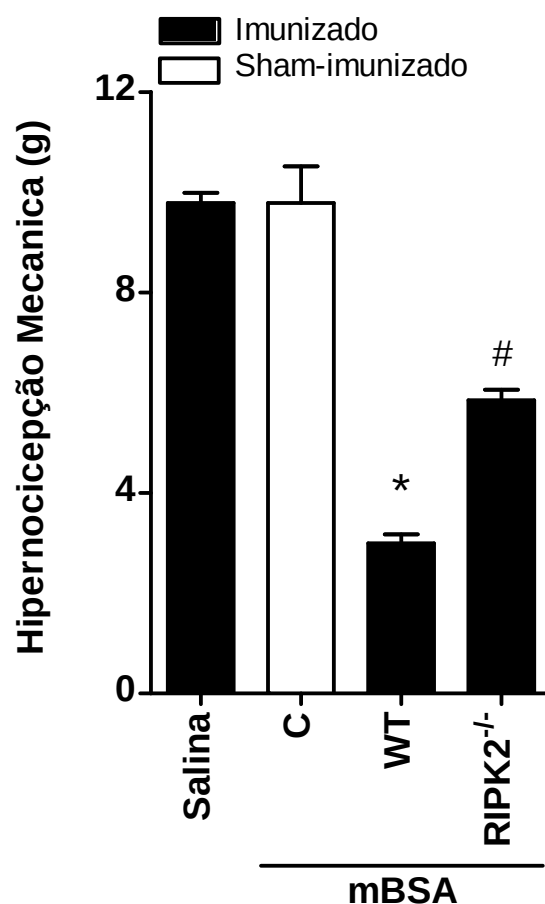
A artrite induzida por antígeno é caracterizada por uma infiltração precoce maciça de neutrófilos na cavidade articular e também por uma intensa nocicepção mecânica. Neste ponto fomos averiguar a importância do RIPK2 no desenvolvimento dos parâmetros inflamatórios no processo da artrite induzida por antígeno. Camundongos selvagens e deficientes para RIPK2 foram imunizados e desafiados conforme descrito. Camundongos selvagens sham-imunizados também receberam injeção intra-articular de mBSA. Observou-se que 6 horas após o desafio com mBSA na articulação dos camundongos selvagens imunizados ocorreu uma infiltração proeminente de neutrófilos e hipernocicepção mecânica. Ambos os eventos apresentaram-se reduzidos nos camundongos *RIPK2*<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados desafiados com mBSA (**figuras 28 e 29**).



**Figura 27. Expressão de RIPK2 nas células mononucleares do sangue periférico ou leucócitos totais do líquido sinovial de pacientes com AR ou OA.** Expressão do mRNA de RIPK2 em amostras de pacientes com AR ou OA expressa em relação ao gene da GAPDH ( $2^{-\text{delta valor Ct}} \times 1.000$ ). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 28. Migração de neutrófilos.** Camundongos selvagens (WT) e *RIPK2*<sup>-/-</sup> imunizados e sham-imunizados foram desafiados com o mBSA (10 µg; i.a.), e 6 horas depois, a migração de neutrófilos foi calculada e comparada com a de camundongos imunizados desafiados com salina (controle). Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



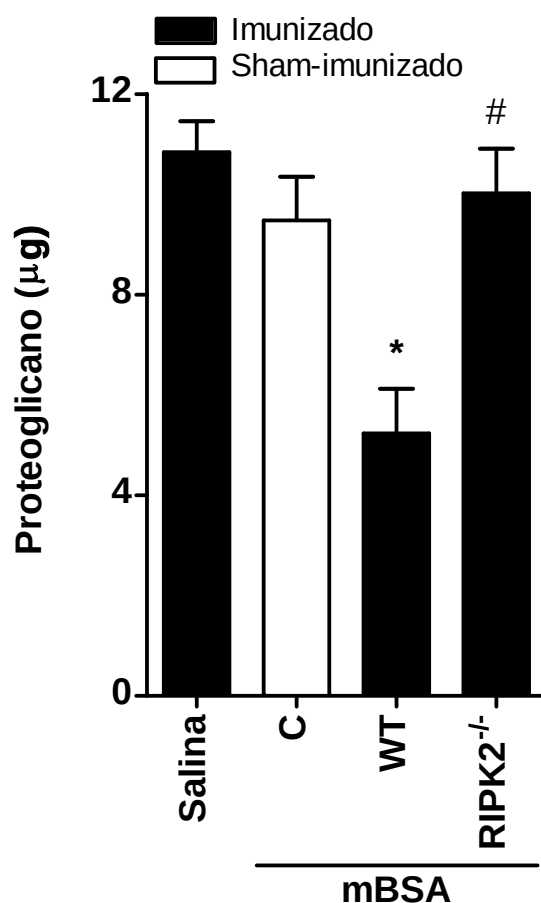
**Figura 29. Hipernocicepção mecânica.** Hipernocicepção mecânica induzida por injeção i.a. de mBSA (30 µg; i.a.) em camundongos WT, *RIPK2*<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados, e 6 horas depois, a resposta hipernociceptiva foi determinada e comparada com os camundongos imunizados desafiados com salina (controle). Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

#### **4.15. Os camundongos deficientes para RIPK2 são protegidos contra lesão**

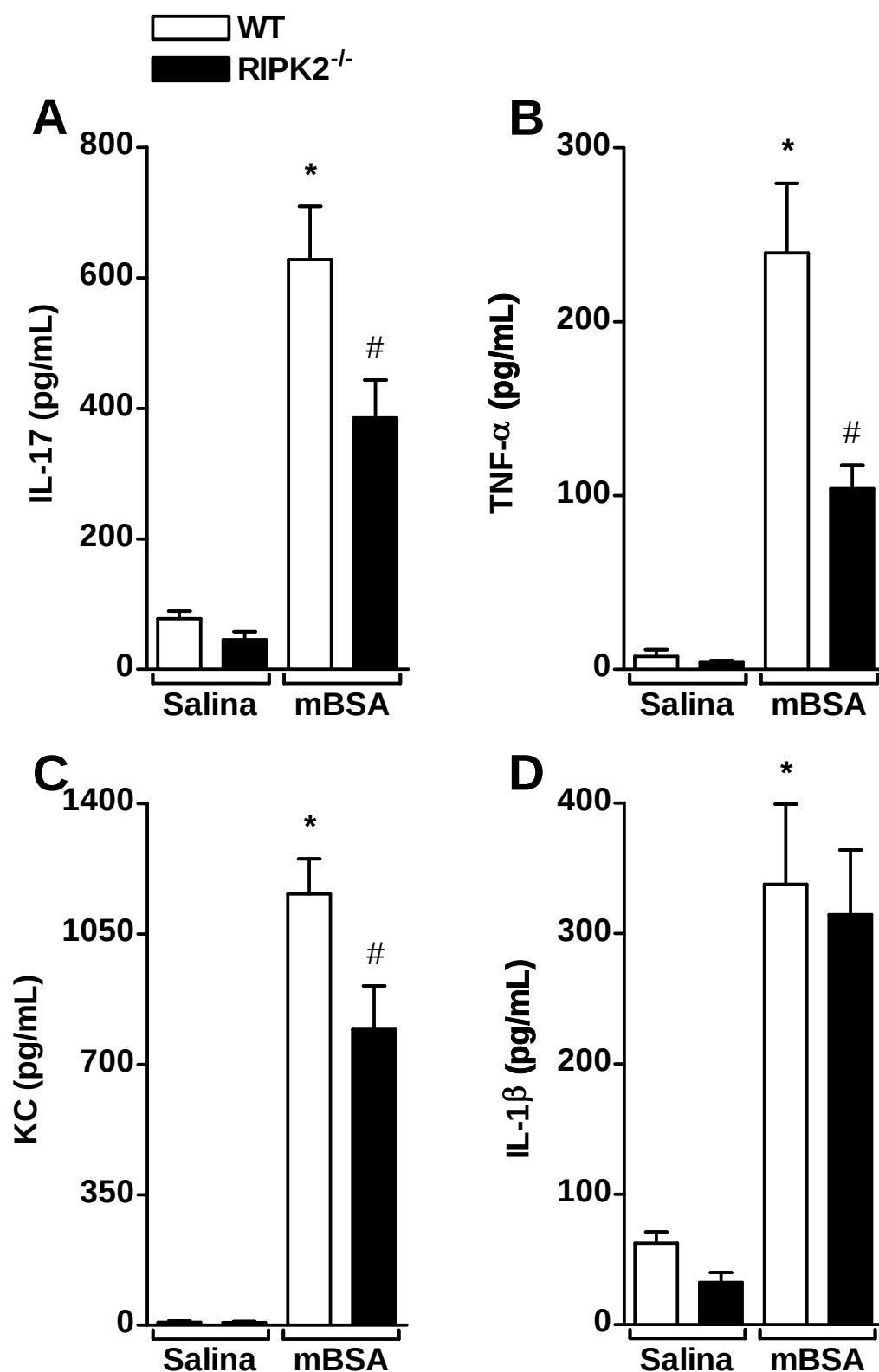
A erosão da cartilagem articular causada pela degradação da matriz extracelular é uma característica da artrite. Assim, avaliamos a erosão da cartilagem na artrite induzida por mBSA a partir da quantificação de proteoglicanas na articulação de camundongos 7 dias após um segundo desafio com o mBSA, conforme descrito anteriormente. Neste conjunto de experimento observou-se que camundongos selvagens tem uma perda significativa nos níveis de proteoglicanas comparados com camundongos controle, e essa redução de proteoglicanas foi menos acentuada em camundongos *RIPK2*<sup>-/-</sup> (figura 30).

#### **4.16. Camundongos *RIPK2*<sup>-/-</sup> apresentam menores níveis de IL-17, TNF- $\alpha$ e KC**

Como os camundongos *RIPK2*<sup>-/-</sup> apresentaram redução na migração de neutrófilos e hipernocicepção, bem como menor perda de proteoglicanas, fomos verificar os níveis de citocinas envolvidas com o padrão de resposta T<sub>H</sub>17, a IL-17 e a IL-1 $\beta$ , bem como os mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e KC/CXCL1. Camundongos selvagens e deficientes para RIPK2 foram imunizados e desafiados conforme descrito. Doze horas após o desafio com mBSA, ou salina, a articulação destes animais foram coletadas e processadas para a dosagem de IL-17, TNF- $\alpha$ , KC/CXCL1 e IL-1 $\beta$ . A redução nos parâmetros inflamatórios em camundongos *RIPK2*<sup>-/-</sup> foi associada com uma redução nos níveis das citocinas IL-17, TNF- $\alpha$  e da quimiocina KC/CXCL1, porém não de IL-1 $\beta$  (figura 31, A – D).



**Figura 30. Avaliação de lesão articular.** A estimativa da perda de proteoglicanos induzida por injeção i.a. de mBSA (30 μg; i.a.) em camundongos WT e *RIPK2*<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados. Os camundongos imunizados desafiados com salina foram utilizados como controle. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 31. RIPK2 modula a produção de citocinas.** As concentrações de IL-17 (A), TNF-α (B), KC (C) e IL-1β (D) na cavidade articular foram determinados 12 horas após o desafio com o mBSA (10 µg; i.a.) ou salina em camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

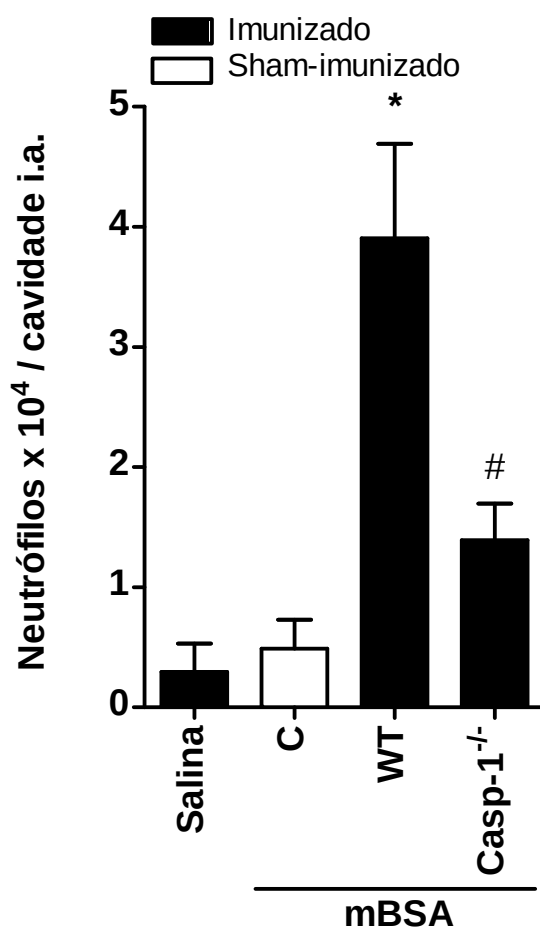
#### **4.17. Os parâmetros inflamatórios estão reduzidos no caspase-1<sup>-/-</sup>**

A artrite induzida por antígeno é caracterizada por uma infiltração precoce maciça de neutrófilos na cavidade articular e também por uma intensa nocicepção mecânica. Neste ponto fomos averiguar a importância da caspase-1 no desenvolvimento dos parâmetros inflamatórios no processo da artrite induzida por antígeno. Camundongos selvagens e deficientes para caspase-1 foram imunizados e desafiados conforme descrito. Camundongos selvagens sham-imunizados também receberam injeção intra-articular de mBSA. Observou-se que 6 horas após o desafio com mBSA na articulação dos camundongos selvagens imunizados ocorreu uma infiltração proeminente de neutrófilos e hipernocicepção mecânica. Ambos os eventos apresentaram-se reduzidos nos camundongos caspase-1<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados desafiados com mBSA (**figura 32 e 33**).

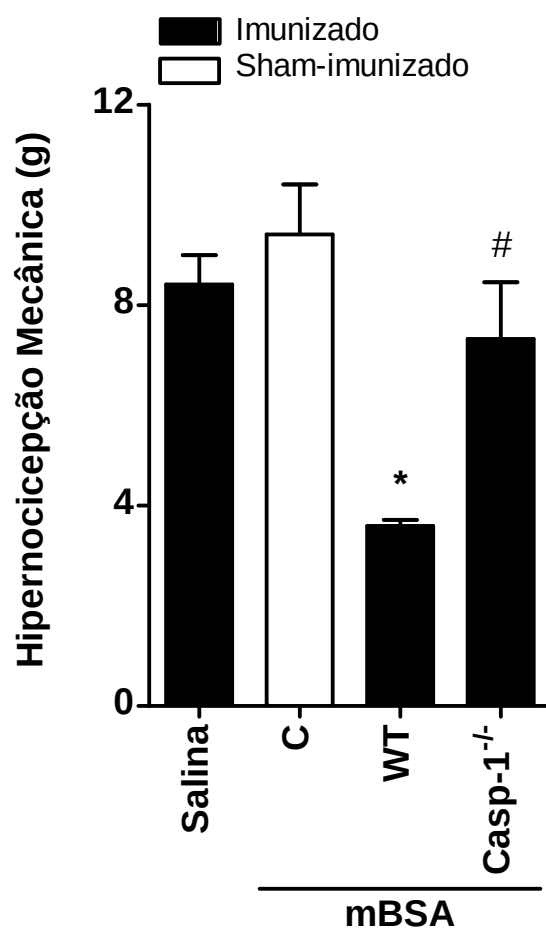
#### **4.18. Os camundongos deficientes para caspase-1 são protegidos contra lesão**

A erosão da cartilagem articular causada pela degradação da matriz extracelular é uma característica da artrite. Assim, avaliamos a erosão da cartilagem na artrite induzida por mBSA a partir da quantificação de proteoglicanas na articulação de camundongos 7 dias após um segundo desafio com o mBSA, conforme descrito anteriormente. Neste conjunto de experimento observou-se que camundongos selvagens tem uma perda significativa nos níveis de proteoglicanas comparados com camundongos controle, e essa redução de proteoglicanas não foi observada em camundongos caspase-1<sup>-/-</sup> (**figura 34**). Estes resultados podem ser diretamente visualizados por análise histopatológica na coloração de cartilagem por o-safranina (**figura 35**).

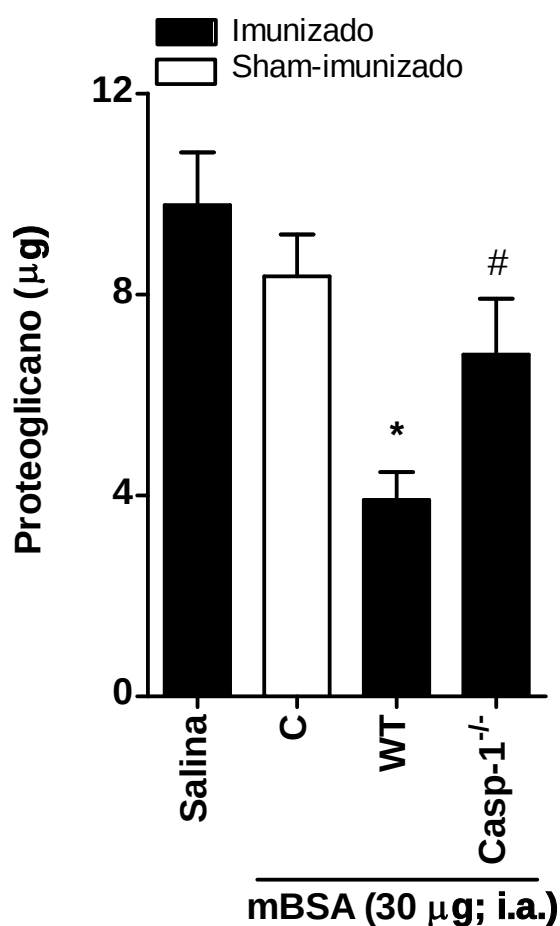




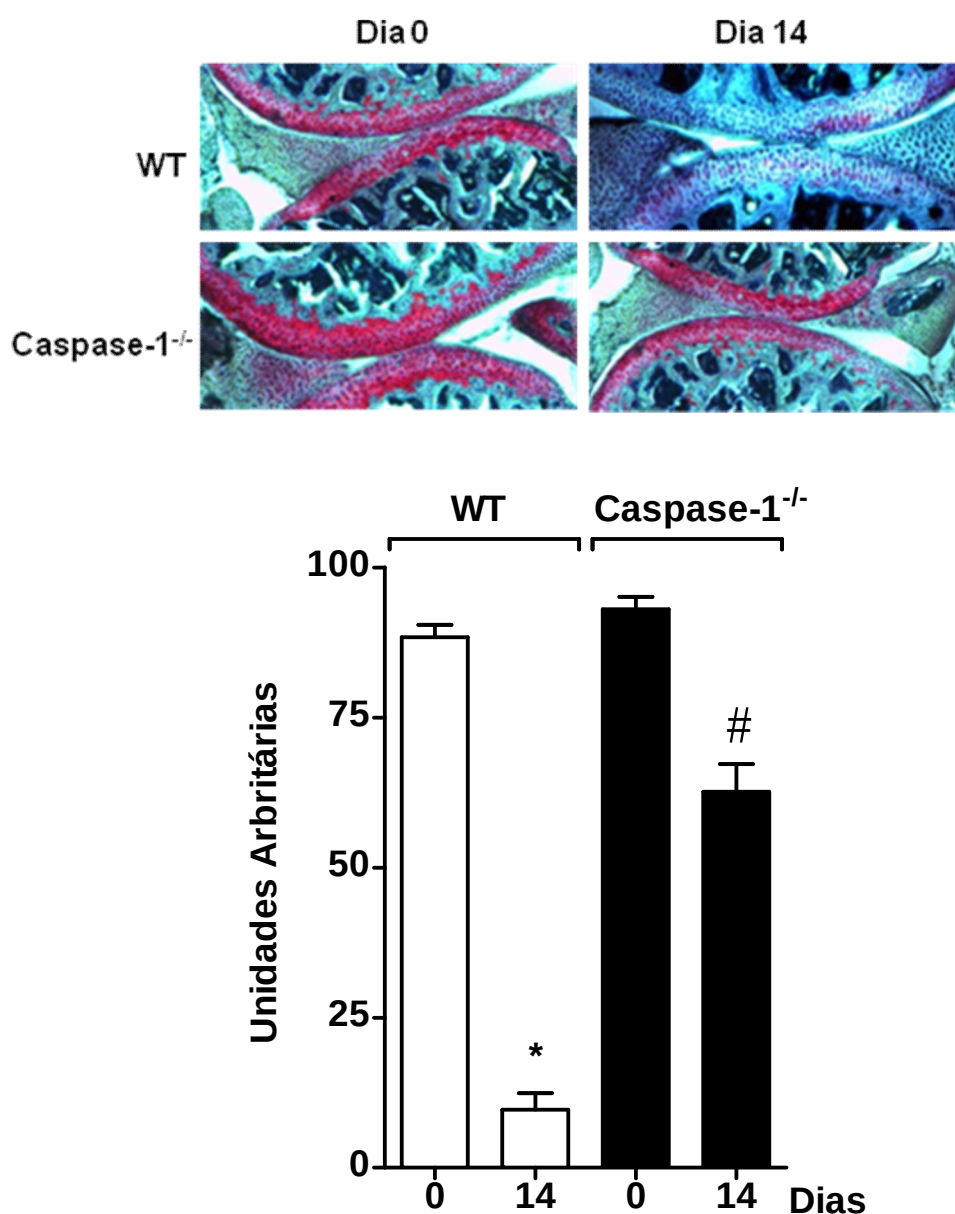
**Figura 32. Migração de neutrófilos.** Camundongos selvagens (WT) e caspase-1<sup>-/-</sup> imunizados e sham-imunizados foram desafiados com o mBSA (10 µg; i.a.), e 6 horas depois, a migração de neutrófilos foi calculada e comparada com a de camundongos imunizados desafiados com salina (controle). Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 33. Hipernocicepção mecânica.** Hipernocicepção mecânica induzida por injeção i.a. de mBSA (30  $\mu$ g; i.a.) em camundongos WT, caspase-1<sup>-/-</sup> imunizados ou sham-imunizados, e 6 horas depois, a resposta hipernociceptiva foi determinada e comparada com os camundongos imunizados desafiados com salina (controle). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 34. Avaliação de lesão articular.** A estimativa da perda de proteoglicanos induzida por injeção i.a. de mBSA (30 µg; i.a.) em camundongos selvagens (WT) e *Caspase-1*<sup>-/-</sup> (*Casp-1*<sup>-/-</sup>) imunizados ou sham-imunizados. Os camundongos imunizados desafiados com salina foram utilizados como controle. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \**P*<0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 35. Avaliação de lesão articular.** Análise histológica da cartilagem articular em camundongos selvagens (WT) e *Caspase-1<sup>-/-</sup>* imunizados. As articulações do joelho foram submetidas a coloração com O-safranina “fast green staining”. As análises de lesão foram feitas com software ImageJ com base em detecção de colorações por ROI. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

#### 4.19. Níveis de mediadores inflamatórios em camundongos *caspase-1*<sup>-/-</sup>

Como os camundongos *caspase-1*<sup>-/-</sup> apresentaram redução na migração de neutrófilos e hipernocicepção, bem como menor perda de proteoglicanas, fomos verificar os níveis de citocinas envolvidas com o padrão de resposta T<sub>H</sub>17, a IL-17 e a IL-1 $\beta$ , bem como os mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e KC/CXCL1. Camundongos selvagens e deficientes para caspase-1 foram imunizados e desafiados conforme descrito. Doze horas após o desafio com mBSA, ou salina, a articulação destes animais foram coletadas e processadas para a dosagem de IL-17, TNF- $\alpha$ , KC/CXCL1 e IL-1 $\beta$ . A redução nos parâmetros inflamatórios em camundongos *caspase-1*<sup>-/-</sup> foi associada com uma redução nos níveis das citocinas IL-17, IL-1 $\beta$  e da quimiocina KC/CXCL1, porém não de TNF- $\alpha$  (**figura 36, A – D**).

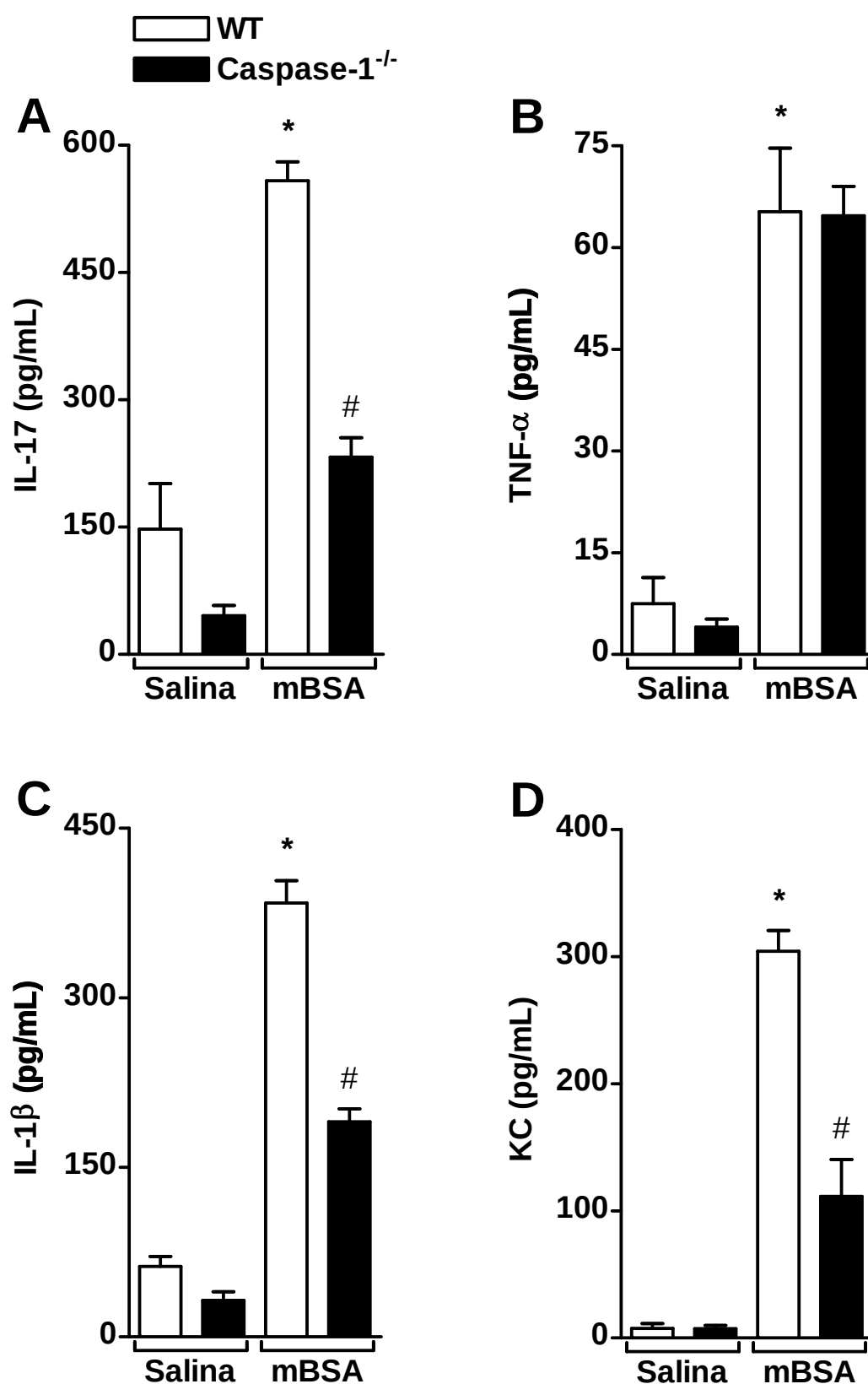


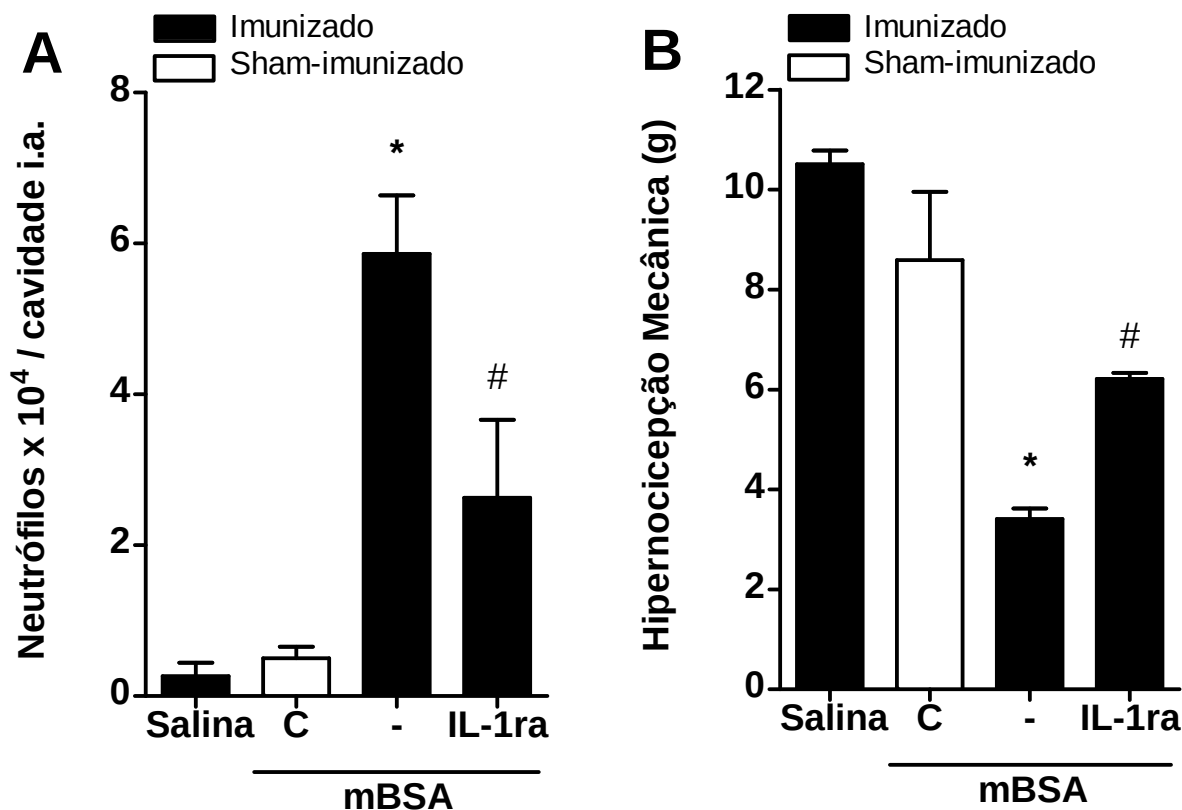
Figura 3. Caspase-1 modula a produção de citocinas. As concentrações de IL-17 (A), TNF-α (B), IL-1β (C) e KC (D) na cavidade articular foram determinados 12 horas após o desafio com o mBSA (10 µg; i.a.) ou salina em camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

#### **4.20. Os parâmetros inflamatórios são reduzidos em camundongos tratados com IL-1ra**

A artrite induzida por antígeno é caracterizada por uma infiltração precoce maciça de neutrófilos na cavidade articular e também por uma intensa nocicepção mecânica. Neste ponto fomos confirmar a importância da IL-1ra no desenvolvimento dos parâmetros inflamatórios no processo da artrite induzida por antígeno. Camundongos selvagens foram imunizados e desafiados conforme descrito. Camundongos selvagens sham-imunizados também receberam injeção intra-articular de mBSA. Observou-se que 6 horas após o desafio com mBSA na articulação dos camundongos selvagens imunizados ocorreu uma infiltração proeminente de neutrófilos e hipernocicepção mecânica. Ambos os eventos apresentaram-se reduzidos nos camundongos imunizados que foram tratados com IL-1ra 30 minutos antes do desafio (**figura 37, A e B**).

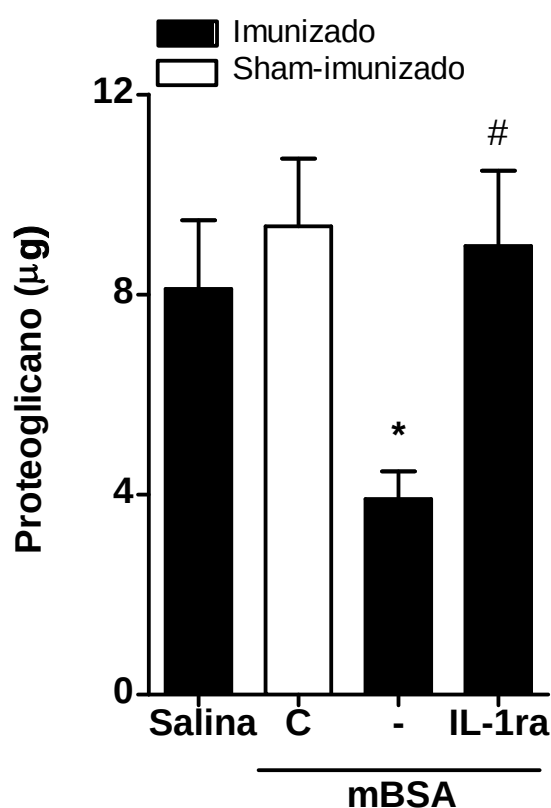
#### **4.21. Os camundongos tratados com IL-1ra são protegidos contra lesão**

A erosão da cartilagem articular causada pela degradação da matriz extracelular é uma característica da artrite. Assim, avaliamos a erosão da cartilagem na artrite induzida por mBSA a partir da quantificação de proteoglicanas na articulação de camundongos 7 dias após um segundo desafio com o mBSA, conforme descrito anteriormente. Neste conjunto de experimento observou-se que camundongos selvagens tem uma perda significativa nos níveis de proteoglicanas comparados com camundongos controle, e essa redução de proteoglicanas não foi observada em camundongos tratados com IL-1ra durante 7 dias após o desafio (**figura 38**).



**Figura 37. Migração de neutrófilos e hipernociceção mecânica.** (A) Camundongos selvagens (WT) imunizados e sham-imunizados foram tratados com IL-1ra 30 minutos antes do desafio com mBSA (10 µg; i.a.), e 6 horas depois, a migração de neutrófilos foi calculada e comparada com a de camundongos imunizados desafiados com salina (controle). (B) hipernociceção mecânica induzida por injeção i.a. de mBSA (30 µg; i.a.) em camundongos WT tratados ou não com IL-1ra, imunizados ou sham-imunizados, e 6 horas depois, a resposta hipernociceptiva foi determinada e comparada com os camundongos imunizados desafiados com salina (controle). Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).





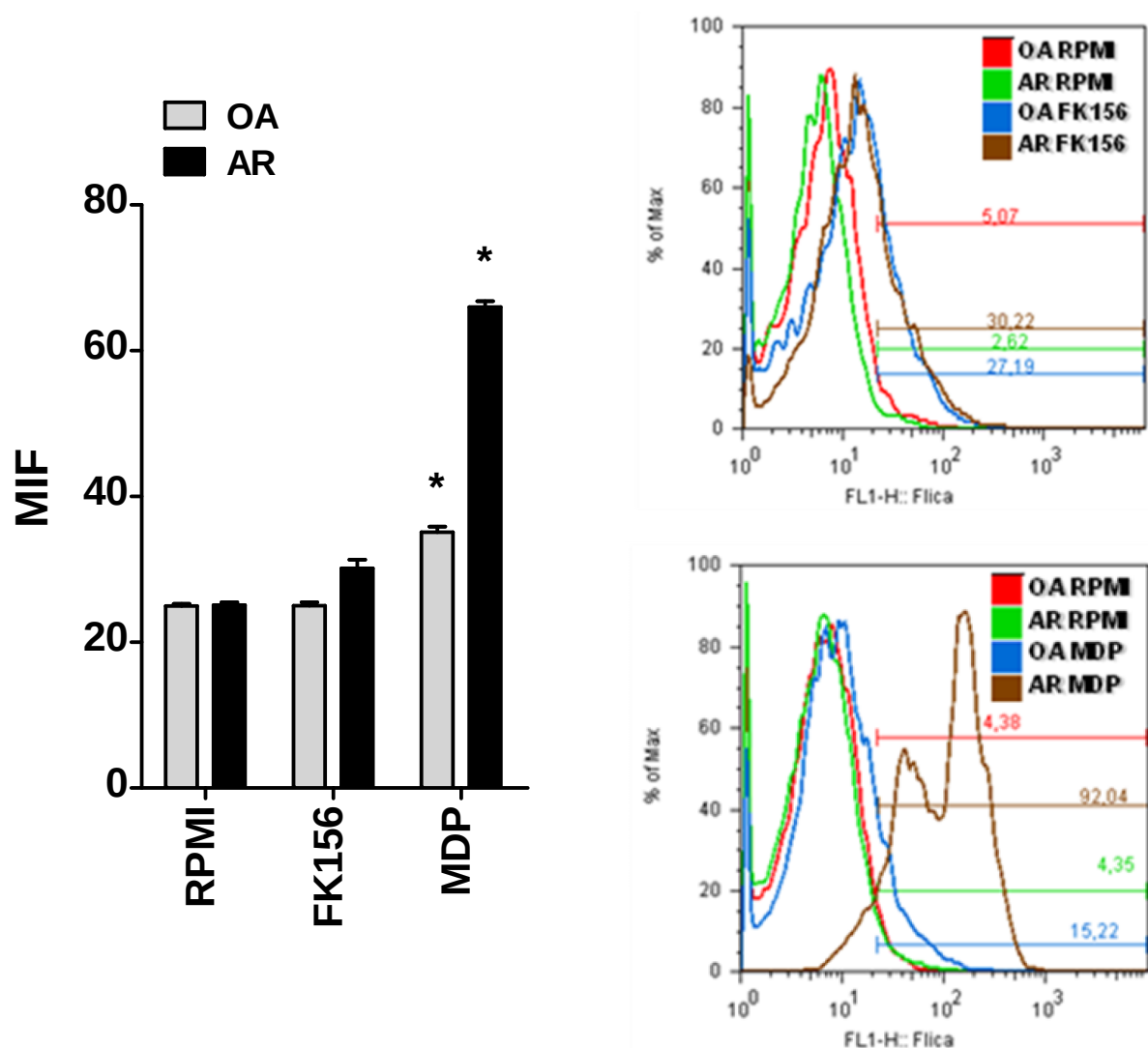
**Figura 38. Avaliação de lesão articular.** A estimativa da perda de proteoglicanos induzida por injeção i.a. de mBSA (30 µg; i.a.) em camundongos selvagens (WT) e WT tratados com IL-1ra imunizados ou sham-imunizados. Os camundongos imunizados desafiados com salina foram utilizados como controle. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

#### **4.22. Ativação da caspase-1 via NOD2**

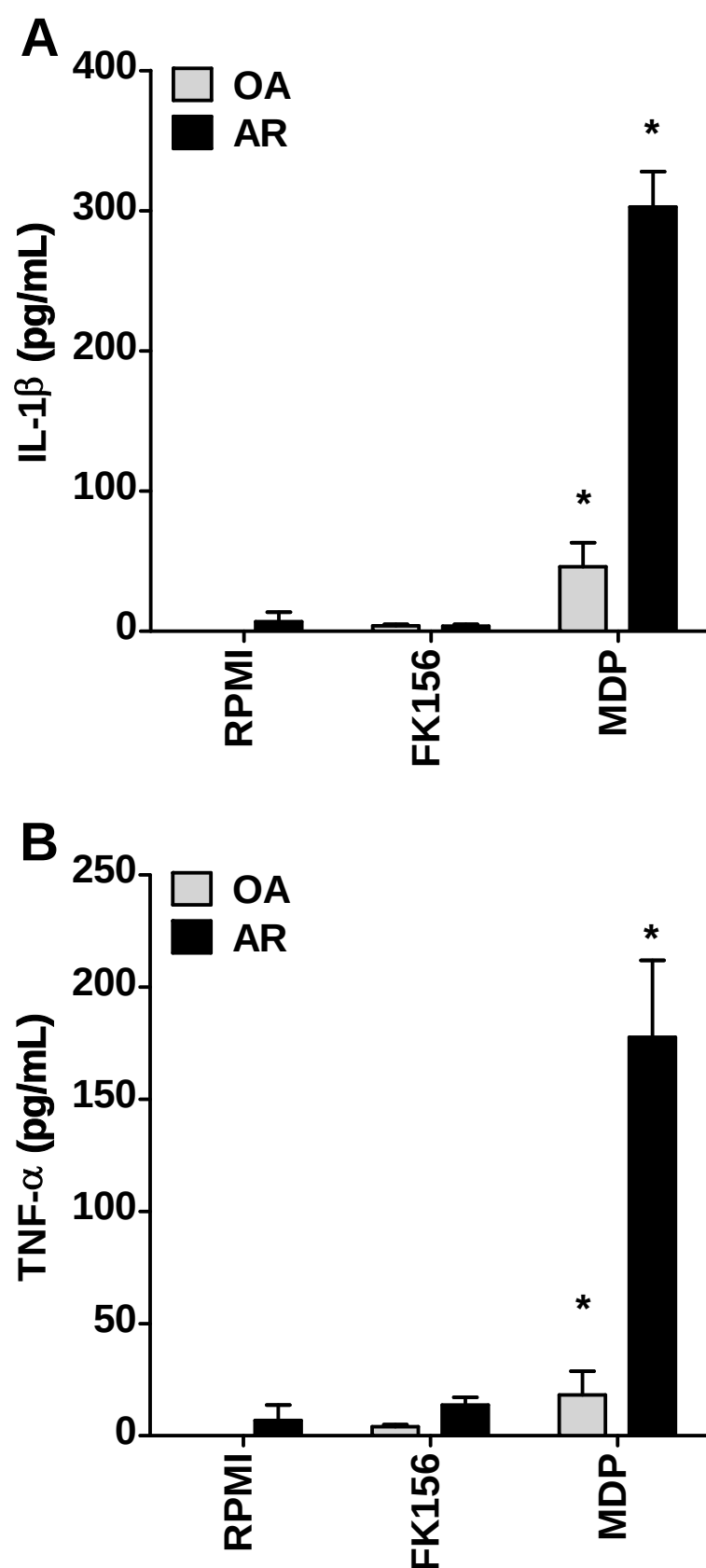
Para verificar se a expressão dos componentes da sinalização do NOD2 é funcional na AR, estimulamos com ligante específico de NOD2 (MDP) células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR e OA. A estimulação do receptor NOD2 com MDP induziu um aumento da caspase-1 ativa em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR, em comparação aos pacientes AO, porém o FK156 (agonista NOD1) não foi capaz de ativar a caspase-1 (**figura 39**).

#### **4.23. Produção de citocinas a partir do estímulo de NOD2**

Observamos que a ativação de NOD2 leva ao aumento da produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR, em comparação pacientes com OA. Assim, observamos nitidamente que a sinalização por NOD2 está sobre-regulada tanto nas células mononucleares sistêmicas quanto na articulação de pacientes com AR (**figura 40, A e B**).



**Figura 39. Expressão de caspase-1 ativa em células mononucleares do sangue periférico pacientes com AR ou OA.** Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR ou AO foram incubadas por 12 horas com RPMI, FK156 (10 µg/mL) ou MDP (100 µg/mL). Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=5). \* $P < 0,05$  quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).



**Figura 40. MDP induz a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .** Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR ou AO foram estimuladas por 12 horas com RPMI, FK156 (10  $\mu$ g/mL) ou MDP (100  $\mu$ g/mL). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P$ <0,05 quando comparado aos animais controle (One-way ANOVA com correção pelo pós-teste de Bonferroni).

***Discussão***

## 5. Discussão

Dentre as teorias propostas para o início das respostas imunes, duas têm gerado bastante alteração: a teoria do reconhecimento de padrões moleculares e a teoria do sinal de perigo. A primeira sugere que organismos invasores induzem uma resposta imune inata, o que por sua vez, pode levar ao desencadeamento de uma resposta imune adaptativa (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Já a teoria do sinal de perigo afirma que as células lesionadas liberam sinais de alarme que ativam as células apresentadoras de antígenos (APCs). No caso dos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), as duas proposições são aplicáveis. Os receptores PRRs podem reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e também sinais próprios anormais ou de perigo, tais como DNA, RNA ou ácido úrico, que normalmente não estariam presentes no exterior das células, ou em certos locais dentro da célula (MARTINON; TSCHOPP, 2005; MARIATHASAN *et al.*, 2006; MARTINON *et al.*, 2006).

Dentre os PRRs, os receptores do tipo NOD (domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo – NLRs) detectam agentes patogênicos, produtos de células danificadas e metabolitos endógenos que podem estar potencialmente envolvidos na iniciação, amplificação e progressão da resposta inflamatória em doenças reumáticas (SIDIROPOULOS *et al.*, 2008). A presença dos receptores NOD1 e NOD2 na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatóide (AR) reforçam o indício de que eles podem estar intimamente ligados ao início do processo inflamatório da AR (OSPELT *et al.*, 2009).

Com base nessas hipóteses, decidimos investigar a participação dos receptores NOD1 e NOD2 na patogênese da artrite reumatóide utilizando células imunes derivadas de pacientes com AR, bem como em um modelo experimental dessa doença. Inicialmente, nós observamos que a expressão do mRNA para NOD2 está muito elevada nas células brancas do líquido sinovial e do sangue periférico dos pacientes com AR quando comparada com os níveis detectados em células de pacientes com osteoartrite (OA). O mesmo não ocorre com o NOD1, em que a expressão do mRNA desse receptor não apresentou diferenças significativas entre as células desses pacientes.

Dados recentes da literatura demonstram que o NOD2 é funcional na articulação de camundongos, onde promove inflamação (ROSENZWEIG *et al.*, 2009). E, além disso, a administração sistêmica ou local (intra-articular) de MDP (um agonista NOD2), peptidoglicano ou fragmentos da parede celular de *Streptococcus pyogenes* resultam em significativa inflamação articular dependente de NOD2 (JOOSTEN *et al.*, 2008; ROSENZWEIG *et al.*, 2009). É importante mencionar que, nesses estudos, a indução da artrite em camundongos foi feita pela administração de componentes bacterianos – o que principalmente desfecha mecanismos inflamatórios relacionados à imunidade inata.

No intuito de examinarmos o envolvimento do receptor NOD2 na inflamação imune adaptativa, a qual é fundamental nos mecanismos patogênicos da AR, neste trabalho nós utilizamos o modelo de artrite induzida por antígeno, que consiste na administração intraarticular de mBSA em camundongos previamente imunizados. O modelo murino de artrite induzida por mBSA é um modelo adequado e um sistema experimental reproduzível, que exhibe numerosas características similares às aquelas

observadas na AR humana, tais como achados histopatológicos e degradação de cartilagem (BRACKERTZ *et al.*, 1977). Neste modelo, a resposta imune adaptativa é dependente de células T CD4+ e é mediada numa menor proporção por anticorpos presentes no soro (POHLERS *et al.*, 2004). De fato, as células T CD4+ estão presentes na membrana sinovial de pacientes com AR e são fundamentais no desenvolvimento da patogênese da doença, principalmente, porque são importantes produtoras de mediadores pró-inflamatórios.

Primeiramente, avaliamos a expressão do mRNA do NOD1 e do NOD2 na membrana sinovial de camundongos que foram desafiados intra-articularmente com mBSA. Elevados níveis da expressão de NOD1 foram observados na membrana sinovial de camundongos selvagens imunizados em comparação com camundongos naïve, porém os níveis não alteraram significativamente após desafio com o mBSA. Em contraste, a expressão do mRNA do NOD2 somente aparece elevado na membrana sinovial após desafio com mBSA e em animais imunizados. A sensibilização do animal com adjuvante de Freund, o qual contém extrato bruto de *Mycobacterium tuberculosis*, foi capaz de elevar a expressão basal de NOD1 na membrana sinovial, o que não ocorreu com o NOD2 apesar da imunização conter agonistas deste último receptor. A expressão do NOD2 elevou-se na fase efetora da resposta, após desafio com o mBSA, que sugere a ativação deste receptor por algum componente endógeno pós-desafio com antígeno. Indubitavelmente, o receptor NOD2 apresenta-se importante para modulação do processo inflamatório da artrite, o que nos faz questionar como ele poderia estar participando da patogênese da doença.



A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica caracterizada por recrutamento de leucócitos, dor e destruição progressiva das articulações, resultando em incapacidade e perda na qualidade de vida (SMOLEN *et al.*, 2007). Resultados prévios do nosso grupo demonstraram que a artrite-induzida por antígeno (AIA) é caracterizada por uma rápida e massiva infiltração de neutrófilos na cavidade articular e também por uma diminuição do limiar nociceptivo mecânico, indicando o aparecimento de um importante sintoma na artrite, a hiperalgesia (PINTO *et al.*, 2009). Com base nestas informações, fomos verificar se o NOD1 ou o NOD2 poderiam interferir na consolidação da AIA. Observamos que, 24 horas após o desafio com mBSA na articulação do joelho de camundongos imunizados selvagens e *NOD1*<sup>-/-</sup>, havia uma proeminente infiltração de neutrófilos na articulação e hipernocicepção mecânica. Ambos os eventos não foram observados em camundongos imunizados *NOD2*<sup>-/-</sup>, os quais também foram desafiados com mBSA.

Em adição ao recrutamento de neutrófilos e a dor, a erosão da cartilagem articular causada pela quebra da matriz extracelular é também uma marca da artrite (HUBER *et al.*, 2006). O processo da erosão começa a acontecer quando a sinovite desobedece as fronteiras e abanca infiltrando no osso e na cartilagem articular, o que denominamos “pannus”. A formação do pannus facilita a ativação de osteoclastos e condrócitos, os quais são responsáveis pelos danos causados no osso e cartilagem. Na tentativa de avaliar a erosão da cartilagem na artrite induzida por mBSA, nós quantificamos os níveis de proteoglicanas na articulação de camundongos desafiados com o antígeno. Neste conjunto de experimentos, nós observamos que os camundongos selvagens e *NOD1*<sup>-/-</sup> apresentaram significativamente baixos níveis de proteoglicanas em comparação aos camundongos controle, enquanto esta redução nas proteoglicanas não era

observada nos camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup>. Para uma visualização direta e confirmação do dano na camada superficial de cartilagem, fizemos uma análise histopatológica de cortes da articulação corados com o-safranina, o que nos mostrou uma maior resistência do camundongo *NOD2*<sup>-/-</sup> em sofrer lesão cartilaginosa na AIA. A diminuição nos parâmetros inflamatórios articular nos camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> está associada com a redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias o que inclui o TNF- $\alpha$  e a quimiocina KC/CXCL1, ao contrário dos animais selvagens ou *NOD1*<sup>-/-</sup> em que estes mediadores apresentam-se elevados na cavidade articular. O TNF- $\alpha$  e a KC/CXCL1 participam da orquestração do processo inflamatório ao auxiliar no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório, células estas que podem ajudar a promover a lesão da cartilagem e também a erosão óssea conforme discutido a seguir.

As duas últimas décadas testemunharam a descoberta de vários importantes fatores solúveis e moléculas da superfície celular que estão envolvidas na mediação da diferenciação dos osteoclastos e reabsorção óssea. Dentre as descobertas de maior importância estão o ligante ativador do receptor do fator nuclear- $\kappa$ B (RANKL) e seu receptor RANK. É interessante notar que as interações RANKL/RANK foram descritas primeiramente em relação às atividades de apresentação de antígenos (WONG *et al.*, 1997) e pesquisas subsequentes, no intuito de esclarecer se os neutrófilos poderiam agir como células apresentadoras de antígenos, revelaram a presença de RANKL na membrana destes polimorfonucleares (POUBELLE *et al.*, 2007).

Poubelle e colaboradores verificaram que o influxo de neutrófilos associados com AR ativa não foi visto no tecido sinovial de pacientes, mas esteve presente no

líquido sinovial (POUBELLE *et al.*, 2007). De forma não menos importante, a expressão de RANKL na membrana dos neutrófilos ativados, ou liberada por eles, é suscetível em provocar a erosão óssea através da ativação dos osteoclastos, como ocorre na artrite experimental induzida por componentes bacterianos (SAKURAI *et al.*, 2003). Quando ocorrem surtos inflamatórios nos pacientes com AR, um grande número de neutrófilos ativados são rapidamente recrutados para a articulação e agregam-se no líquido sinovial. A rápida liberação de fatores que regulam o metabolismo ósseo, como RANKL, por estas células, pode proporcionar um grande, e transitório, aumento nos níveis de RANKL na articulação, suplementando os níveis fornecidos pelas células inflamatórias crônicas presentes no tecido sinovial. Isso pode resultar em estimulação rápida da degradação da cartilagem e erosão óssea durante as crises da doença na AR ativa. Neste íterim, observamos que camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> possuíam menor expressão de mRNA para RANKL na articulação em comparação aos camundongos selvagens ou *NOD1*<sup>-/-</sup>.

Outro achado intrigante foi o fato de que as células do linfonodo dos camundongos deficientes para o receptor NOD2 exibiram uma produção de IL-2 normal, bem como proliferação normal em resposta aos estímulos com mBSA ou estímulo inespecífico (ConA). Somando-se a estes dados, a produção de IgG específico contra o mBSA apresentou-se normal. Logo, sob estas condições experimentais, a resposta inflamatória reduzida no camundongo deficiente para NOD2 não está relacionada ao processo de imunização e constituintes do CFA (adjuvante) não ativam o NOD2. Estes resultados sugerem que a função do NOD2 na artrite deve envolver eventos disparados localmente na articulação após o desafio com o mBSA.

Portanto, uma questão inevitável que surgiu destes achados foi: como o receptor NOD2 poderia estar modulando a resposta inflamatória articular? Os eventos inflamatórios na AR são primordialmente mediados por citocinas e quimiocinas. Dentre as vertentes hoje levantadas, a hipótese atual, e a mais abordada, é a de que a citocina IL-17 derivada de células T<sub>H</sub>17 tem função fundamental na patofisiologia da AR (CHABAUD *et al.*, 1999). Esta proposição tem sido suportada por estudos que mostram que a inibição genética ou farmacológica da atividade ou produção da IL-17 diminui os eventos da artrite experimental, tais como migração de leucócitos, ativação de osteoclastos e erosão de cartilagem e osso (LUBBERTS *et al.*, 2004). Então, analisando a cavidade articular de camundongos selvagens e *NOD1*<sup>-/-</sup>, observamos níveis elevados de IL-17 nestes animais artríticos, porém os níveis desta citocina estavam consideravelmente reduzidos na articulação de camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup>. Estes resultados apontam para o envolvimento do NOD2 na modulação da resposta tipo T<sub>H</sub>17.

Embora dados da literatura sugiram que a diferenciação de células T<sub>H</sub>17 é iniciada em linfonodos drenantes e que estas células são recrutadas para o sítio da inflamação, evidências recentes sugerem que as células produtoras de IL-17 podem ser geradas localmente na sinóvia em resposta a citocinas locais produzidas por macrófagos inflamatórios (EGAN *et al.*, 2008). Corroborando com estes achados, dados da literatura indicam a presença de linfócitos produtores de IL-17 na membrana sinovial de pacientes com AR (MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009). Em concordância com estas proposições e com nossa hipótese de que o NOD2 pode exercer função importante na gênese local na resposta imune induzida pela IL-17, nós observamos níveis da expressão de mRNA de citocinas cruciais que instruem e direcionam células para o padrão T<sub>H</sub>17, tais como a IL-6 e a IL-23, e também os

níveis de IL-1 $\beta$  estão bastante reduzidos na membrana sinovial de camundongos deficientes para NOD2 em comparação com os camundongos selvagens ou *NOD1*<sup>-/-</sup>. Então, a ativação de NOD2 nas células apresentadoras de antígeno da articulação pode disparar a produção destas citocinas favorecendo uma resposta T<sub>H</sub>17. Esta hipótese é também suportada por dados recentes que mostram que a ativação de NOD2 nas células dendríticas humanas leva ao aumento da produção de IL-17 pelas células T de memória de maneira dependente da IL-23 e IL-1 $\beta$  (VAN BEELEN *et al.*, 2007). Em amostras clínicas, nós observamos que nas amostras de células mononucleares do sangue e do líquido sinovial de pacientes com AR, que apresentaram aumento na expressão de NOD2, a expressão do mRNA da IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  também estava elevada em comparação as mesmas amostras de pacientes com OA. De fato, tal resultado reforça a ligação do receptor NOD2 com a produção de mediadores inflamatórios que ajudam na diferenciação e manutenção das células produtoras de IL-17.

Outro fato importante que observamos foi o mRNA elevado de TGF- $\beta$  na membrana sinovial dos animais naïve, *NOD1*<sup>-/-</sup> e *NOD2*<sup>-/-</sup> pós-desafio com mBSA. Dados recentes da literatura demonstram que o TGF- $\beta$  tem um papel indireto na diferenciação de células T<sub>H</sub>17 (DAS *et al.*, 2009). Na ausência de células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, a IL-6 sozinha é suficiente para induzir a diferenciação de células T<sub>H</sub>17. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que tem sido implicada em muitas doenças inflamatórias e autoimunes (SCHETT, 2008; SCHETT; DAVID, 2008). Em concordância com relatos anteriores, nossos resultados sugerem um papel fundamental da IL-6 no desenvolvimento do padrão de resposta IL-17. Em adição, a neutralização da IL-6, ou o bloqueio de seu receptor por anticorpos, melhorou a inflamação em várias doenças autoimunes (POLLARD; HULTMAN; KONO, 2003). Modalidades de

tratamento baseadas na IL-6 estão atualmente em uso na clínica médica (SEBBA, 2008). Em contraste, o TGF- $\beta$  é muito conhecido pelas suas funções imunossupressoras (WAHL; CHEN, 2003). O TGF- $\beta$  inibe tanto respostas imunes inatas quanto adaptativas, incluindo a diferenciação de células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2. A deficiência em TGF- $\beta$  ou a diminuição na sinalização via TGF- $\beta$  leva a diferenciação espontânea de células T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2 (GORELIK; FLAVELL, 2000). Por consequência, animais deficientes em TGF- $\beta$  ou TGF- $\beta$ RIIDN desenvolvem autoimunidade em múltiplos órgãos (KULKARNI; KARLSSON, 1997; GORELIK; FLAVELL, 2000). Somado a estes relatos, dados da literatura indicam que o TGF- $\beta$  é incapaz de inibir a diferenciação de células T<sub>H</sub>17. Logo, os resultados aqui apresentados são consistentes com o estabelecimento das funções do TGF- $\beta$ , o qual pode estar inibindo as respostas imunes tipo T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, consequentemente favorecendo a resposta T<sub>H</sub>17. Como o TGF- $\beta$  não é essencial para a indução da T<sub>H</sub>17, nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura uma vez que não observamos redução nos níveis de TGF- $\beta$  nos camundongos NOD deficientes.

Posteriormente, fomos pesquisar quais vias de sinalização intracelulares poderiam estar envolvidas pós ativação do receptor NOD2. Dados da literatura sugerem que o receptor NOD1 e o NOD2 após ativação sinalizam via RIPK2, que é uma serina treonina quinase expressa ubiquitivamente e está associada com a indução de apoptose (INOHARA *et al.*, 1998; MCCARTHY; NI; DIXIT, 1998). Interessantemente, publicações recentes demonstraram que o RIPK2 realmente é uma molécula efetora “downstream” de NOD1 e NOD2, mas não dos receptores tipo Toll. Realmente, a sinalização via NOD é prejudicada em macrófagos provenientes de camundongos deficientes para RIPK2 quando estimulados com agonistas NOD1

ou NOD2 (PARK *et al.*, 2007). Logo, no desígnio de analisar a participação de RIPK2 no processo inflamatório da artrite, avaliamos sua expressão, por PCR quantitativo em tempo real, nas células mononucleares sistêmicas e do líquido sinovial de pacientes com AR ou OA. Elevados níveis de expressão do mRNA do RIPK2 foram observados nas células procedentes de pacientes com AR em comparação com os controles OA. Então, nós fomos analisar se o RIPK2 estaria participando da artrite induzida por mBSA. A injeção intra-articular de mBSA induziu elevada migração de neutrófilos e hipernocicepção mecânica nos camundongos selvagens, porém estes parâmetros inflamatórios estavam reduzidos nos camundongos imunizados *RIPK2*<sup>-/-</sup>. Além disso, o desafio com o mBSA não promoveu erosão da cartilagem nos camundongos *RIPK2*<sup>-/-</sup> da forma elevada como foram observadas nos camundongos selvagens nas mesmas condições experimentais.

Como o NOD2, o RIPK2 também parece estar envolvido no processo de colocar em funcionamento a resposta imune IL-17. Os níveis de IL-17 pareceram reduzidos em camundongos *RIPK2*<sup>-/-</sup> imunizados e desafiados com mBSA. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a ativação da sinalização que o RIPK2 estimula a resposta imune IL-17 ainda não foram determinados. Existem evidências indicando que o RIPK2 é uma molécula crítica entre o NOD2 e a ativação do NF- $\kappa$ B, que pode induzir as citocinas que estão envolvidas na promoção das células produtoras de IL-17, tais como a IL-6 e a IL-23 (BROWN; CLAUDIO; SIEBENLIST, 2008).

A diminuição nos parâmetros inflamatórios na articulação dos camundongos *RIPK2*<sup>-/-</sup> também foi associada a uma redução nos níveis das citocinas pró-

inflamatórias como a TNF- $\alpha$  e a quimiocina KC/CXCL1, mas não a IL-1 $\beta$ . Estes resultados merecem notável atenção, uma vez que dados recentes demonstraram que a IL-17 é crítica na estimulação da liberação de TNF- $\alpha$  e quimiocinas por estruturas e células residentes da articulação durante a artrite (LEMOS *et al.*, 2009).

As observações de diminuição nos parâmetros inflamatórios, tais como a migração de neutrófilos, foram menos pronunciadas nos camundongos deficientes para RIPK2 quando comparadas àquelas observadas nos camundongos *NOD2*<sup>-/-</sup> e, além disso, a produção de IL-1 $\beta$  não foi reduzida nos animais *RIPK2*<sup>-/-</sup>, sugerindo que outra via de sinalização pode estar atuando “downstream” do NOD2. Sabemos que os NLRs são PRRs que identificam PAMPs e estão envolvidos na regulação da resposta imune inata, promovendo a ativação de caspases inflamatórias dentro de complexos protéicos, chamado inflamassoma. O inflamassoma típico consiste em um sensor, uma proteína NLR, uma proteína adaptadora e uma proteína efetora, que é uma caspase, a qual ativa citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ . Portanto, a ativação de caspase-1 é uma possível candidata “downstream” do NOD2 (MAEDA *et al.*, 2005). Somado a isso, tem sido demonstrado que a ativação na sinalização de NOD2 contribui diretamente, ou indiretamente, para a formação do inflamassoma e ativação da caspase-1 (STETSON; MEDZHITOV, 2007). Então, fomos investigar a função da caspase-1 na patogênese da AIA. A massiva infiltração de neutrófilos e a intensa hipernocicepção observadas após o desafio intraarticular com mBSA em camundongos selvagens imunizados não eram notadas nos camundongos imunizados deficientes em caspase-1. Além disso, os camundongos *caspase-1*<sup>-/-</sup> mostraram menor perda de proteoglicanas na articulação pós desafio com mBSA, o que foi confirmado por análise histológica da cartilagem com o-safranina. A caspase-1 parece ter uma função crucial na resposta inflamatória ao converter pro-IL-1 $\beta$  e



pro-IL-18 nas formas ativas destas citocinas (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Com relação a esta proposição, dados recentes mostraram que camundongos deficientes para a IL-18 não estão protegidos contra o desenvolvimento da artrite induzida por mBSA (SANTOS *et al.*, 2006), sugerindo que a IL-1 $\beta$  deva ser o mecanismo “downstream” da caspase-1. Afirmando a importância da IL-1 $\beta$ , modelos animais de artrite que desenvolveram uma superprodução de IL-1 $\beta$  apresentaram alterações histopatológicas articulares e na cartilagem semelhantes àsquelas observadas em pacientes com AR (ABRAMSON; AMIN, 2002). Pelos vários indicativos colhidos e, para obtermos mais esclarecimento sobre os mecanismos pelos quais a via NOD2/caspase-1 participa da artrite induzida por mBSA, nós fomos avaliar como estava a produção de IL-1 $\beta$  na articulação dos camundongos deficientes para a caspase-1 que foram submetidos a artrite experimental e observamos, de forma semelhante ao *NOD2*<sup>-/-</sup>, que os níveis de IL-1 $\beta$  estavam reduzidos na cavidade articular. Partimos, então, para o tratamento com a IL-1ra no intuito de confirmarmos que o bloqueio da IL-1 $\beta$  era suficiente para melhorar o quadro da artrite experimental nos camundongos. Verificamos que o tratamento com IL-1ra melhorou consideravelmente os parâmetros inflamatórios da artrite experimental com consequentes reduções na migração de neutrófilos, hipernocicepção e erosão da cartilagem. Corroborando com nossos achados, dados da literatura apontam para o fato de que o bloqueio da IL-1 $\beta$  foi associado com a prevenção da destruição do osso e da cartilagem em modelo murino de artrite induzida por colágeno e, além disso, outros efeitos inflamatórios da IL-1 $\beta$  foram bloqueados pela IL-1ra (DINARELLO, 2000). A destruição óssea e a lesão da cartilagem associadas a altos níveis de IL-1 $\beta$  são pertinentes porque esta citocina tem a capacidade de estimular a diferenciação de precursores de osteoclastos e

aumentar a atividade dos osteoclastos, indicando um papel importante da IL-1 $\beta$  na osteopenia e na destruição articular vista na AR (GOLDRING; GRAVALLESE, 2002). Nas articulações artríticas, a secreção de IL-1 $\beta$  dependente de NOD2/caspase-1 pode mediar vários eventos pró-inflamatórios, mas esta via pode estar amplificando a resposta imune inflamatória a partir do favorecimento da indução de IL-17, conforme discutido anteriormente. Neste contexto, os níveis de IL-17 apresentaram-se reduzidos em camundongos *caspase-1*<sup>-/-</sup> comparados com camundongos selvagens após desafio com mBSA.

O suposto mecanismo de sinalização NOD2/caspase-1 observado na artrite experimental também foi testado em células provenientes de pacientes com AR. Além da observação de que componentes da via de sinalização do NOD2 têm os seus níveis de expressão aumentados no tecido articular e nas células de pacientes com AR, a atividade de NOD2 também está aumentada. MDP, um ligante seletivo de NOD2, induziu a ativação de caspase-1 e liberação de IL-1 $\beta$  em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR, mas não em pacientes com OA. Estes resultados conjuntamente indicam uma forte relação entre o NOD2 e a caspase-1 e corrobora com a importância da IL-1 $\beta$  na artrite reumatóide.

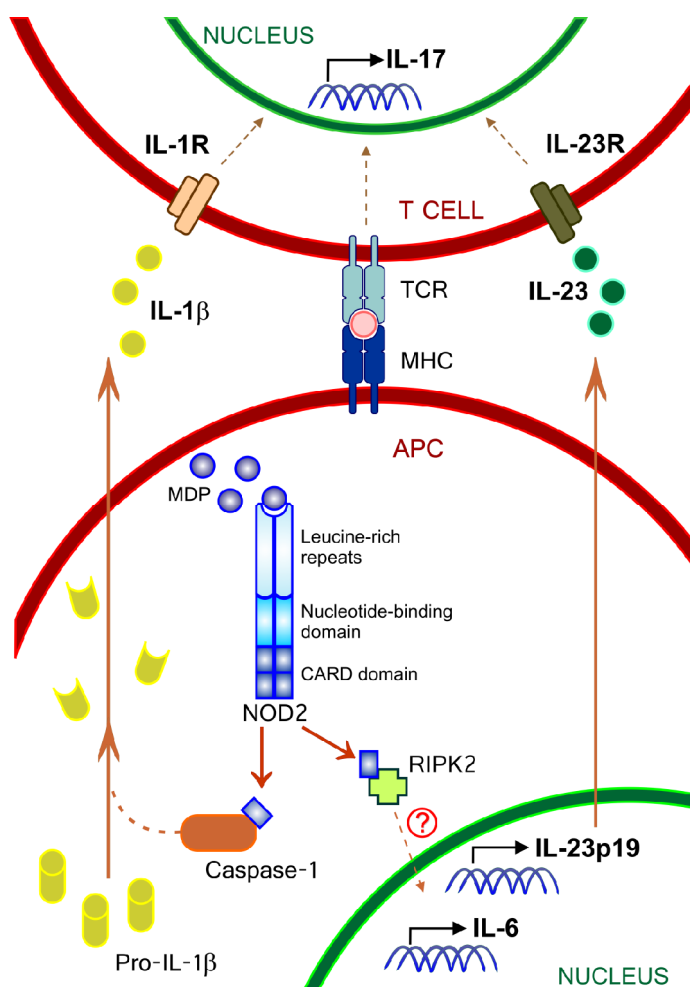
Uma questão importante que surge a partir de nossos resultados é como a via de sinalização do NOD2 é ativada no contexto das articulações artríticas em humanos. Embora estudos futuros sejam necessários para responder esta questão, recentemente foram encontradas altas concentrações do ligante de NOD2 (fragmentos de MDP) existentes na membrana sinovial de pacientes com AR (JOOSTEN *et al.*, 2008). Esta hipótese está em concordância com o pressuposto de que infecções estão implicadas no agravamento da AR. No entanto, é importante

apontar que o NOD2 poderia também estar reconhecendo produtos provenientes de células danificadas e metabólitos endógenos, conforme observado em outros NLRs (SIDIROPOULOS *et al.*, 2008). A concepção de que a produção de citocinas inflamatórias em doenças inflamatórias reumáticas pode ser induzida por sinais endógenos não-infecciosos é um incentivo às pesquisas e ao estudo dos mecanismos da imunidade inata e de sua contribuição para a patogênese das doenças relacionadas ao sistema imune adaptativo. Investigações posteriores e manipulações da via de sinalização do NOD2 podem melhorar as opções terapêuticas para pacientes com AR.

***Conclusões***

## 6. Conclusões

As principais conclusões deste trabalho salientam a importância da sinalização dos receptores NOD na patogênese da artrite. O NOD2 parece ter pelo menos duas funções principais no desencadeamento da cascata de eventos na artrite inflamatória: (1) sua sinalização é através do RIPK2 que, por sua vez, coordena o desenvolvimento de artrite, e (2) o NOD2 também pode desempenhar um papel na ativação da caspase-1. Estes caminhos contribuem para que o NOD2 possa desencadear uma resposta imune IL-17-dependente pelo controle na produção local de IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$ . Juntos, esses eventos cooperam para promover a inflamação articular. Nossos resultados sugerem que a sinalização através do NOD2 constitui um alvo real de pesquisa para o desenvolvimento de novas terapias para o controle da inflamação imune na artrite.



## ***Referências bibliográficas***

## 7. Referências Bibliográficas

- ABBOTT, D. W., WILKINS, A., ASARA, J. M., CANTLEY, L. C. (2004). The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* **24**, 2217-27.
- ABRAMSON, S. B., AMIN, A. (2002). Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. *Rheumatology (Oxford)* **9**, 972-80.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V., NAPOLITANI, G., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. (2007a). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* **9**, 942-9.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V., RIVINO, L., GEGINAT, J., JARROSSAY, D., GATTORNO, M., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F., NAPOLITANI, G. (2007b). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* **6**, 639-46.
- AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **4**, 783-801.
- ARMANT, M. A., FENTON, M. J. (2002). Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* **8**, REVIEWS3011.
- BARCZYK, A., PIERZCHALA, W., SOZANSKA, E. (2003). Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* **6**, 726-33.
- BARNICH, N., AGUIRRE, J. E., REINECKER, H. C., XAVIER, R., PODOLSKY, D. K. (2005). Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* **1**, 21-6.

- BELLAVITE, P. (1988). The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic Biol Med* **4**, 225-61.
- BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., KORN, T., STROM, T. B., OUKKA, M., WEINER, H. L., KUCHROO, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **7090**, 235-8.
- BETTELLI, E., KORN, T., KUCHROO, V. K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* **6**, 652-7.
- BOMBARA, M. P., WEBB, D. L., CONRAD, P., MARLOR, C. W., SARR, T., RANGES, G. E., AUNE, T. M., GREVE, J. M., BLUE, M. L. (1993). Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leukoc Biol* **5**, 399-406.
- BOUGHAN, P. K., ARGENT, R. H., BODY-MALAPEL, M., PARK, J. H., EWINGS, K. E., BOWIE, A. G., ONG, S. J., COOK, S. J., SORENSEN, O. E., MANZO, B. A., INOHARA, N., KLEIN, N. J., NUNEZ, G., ATHERTON, J. C., BAJAJ-ELLIOTT, M. (2006). Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem* **17**, 11637-48.
- BRACKERTZ, D., MITCHELL, G. F., VADAS, M. A., MACKAY, I. R., MILLER, J. F. (1977). Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* **5**, 1639-44.
- BROWN, K. D., CLAUDIO, E., SIEBENLIST, U. (2008). The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **4**, 212.
- BRUSTLE, A., HEINK, S., HUBER, M., ROSENPLANTER, C., STADELMANN, C., YU, P., ARPAIA, E., MAK, T. W., KAMRADT, T., LOHOFF, M. (2007). The



development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* **9**, 958-66.

BUCHHOLZ, K. R., STEPHENS, R. S. (2008). The cytosolic pattern recognition receptor NOD1 induces inflammatory interleukin-8 during *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun* **7**, 3150-5.

BURKHARDT, D., HWA, S. Y., GHOSH, P. (2001). A novel microassay for the quantitation of the sulfated glycosaminoglycan content of histological sections: its application to determine the effects of Diacerhein on cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **3**, 238-47.

CERRETTI, D. P., KOZLOSKY, C. J., MOSLEY, B., NELSON, N., VAN NESS, K., GREENSTREET, T. A., MARCH, C. J., KRONHEIM, S. R., DRUCK, T., CANNIZZARO, L. A., ET AL. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **5053**, 97-100.

CHABAUD, M., DURAND, J. M., BUCHS, N., FOSSIEZ, F., PAGE, G., FRAPPART, L., MIOSSEC, P. (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* **5**, 963-70.

CHABAUD, M., FOSSIEZ, F., TAUPIN, J. L., MIOSSEC, P. (1998). Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* **1**, 409-14.

CHAMAILLARD, M., HASHIMOTO, M., HORIE, Y., MASUMOTO, J., QIU, S., SAAB, L., OGURA, Y., KAWASAKI, A., FUKASE, K., KUSUMOTO, S., VALVANO, M. A., FOSTER, S. J., MAK, T. W., NUNEZ, G., INOHARA, N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* **7**, 702-7.

- CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B., STASKAWICZ, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **4**, 803-14.
- CHU, C. Q., FIELD, M., FELDMANN, M., MAINI, R. N. (1991). Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **9**, 1125-32.
- CUA, D. J., SHERLOCK, J., CHEN, Y., MURPHY, C. A., JOYCE, B., SEYMOUR, B., LUCIAN, L., TO, W., KWAN, S., CHURAKOVA, T., ZURAWSKI, S., WIEKOWSKI, M., LIRA, S. A., GORMAN, D., KASTELEIN, R. A., SEDGWICK, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **6924**, 744-8.
- CUNHA, T. M., VERRI, W. A., JR., VIVANCOS, G. G., MOREIRA, I. F., REIS, S., PARADA, C. A., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* **3**, 401-7.
- DAS, J., REN, G., ZHANG, L., ROBERTS, A. I., ZHAO, X., BOTHWELL, A. L., VAN KAER, L., SHI, Y., DAS, G. (2009). Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J Exp Med* **11**, 2407-16.
- DAYER, J. M., GRAHAM, R., RUSSELL, G., KRANE, S. M. (1977). Collagenase production by rheumatoid synovial cells: stimulation by a human lymphocyte factor. *Science* **4274**, 181-3.
- DEBETS, J. M., VAN DER LINDEN, C. J., DIETEREN, I. E., LEEUWENBERG, J. F., BUURMAN, W. A. (1988). Fc-receptor cross-linking induces rapid secretion of tumor necrosis factor (cachectin) by human peripheral blood monocytes. *J Immunol* **4**, 1197-201.
- DINARELLO, C. A. (2000). The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* **10**, 732-4.

- DOBROVOLSKAIA, M. A., VOGEL, S. N. (2002). Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* **9**, 903-14.
- DUERR, R. H., TAYLOR, K. D., BRANT, S. R., RIOUX, J. D., SILVERBERG, M. S., DALY, M. J., STEINHART, A. H., ABRAHAM, C., REGUEIRO, M., GRIFFITHS, A., DASSOPOULOS, T., BITTON, A., YANG, H., TARGAN, S., DATTA, L. W., KISTNER, E. O., SCHUMM, L. P., LEE, A. T., GREGERSEN, P. K., BARMADA, M. M., ROTTER, J. I., NICOLAE, D. L., CHO, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **5804**, 1461-3.
- EASTGATE, J. A., SYMONS, J. A., WOOD, N. C., GRINLINTON, F. M., DI GIOVINE, F. S., DUFF, G. W. (1988). Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* **8613**, 706-9.
- EBRINGER, A., WILSON, C. (2000). HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *J Med Microbiol* **4**, 305-11.
- EGAN, P. J., VAN NIEUWENHUIJZE, A., CAMPBELL, I. K., WICKS, I. P. (2008). Promotion of the local differentiation of murine Th17 cells by synovial macrophages during acute inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **12**, 3720-9.
- FELDMANN, M., BRENNAN, F. M., FOXWELL, B. M., MAINI, R. N. (2001). The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmun*, 188-99.
- FIERRO, I. M., BARJA-FIDALGO, C., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. (1996). The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils. *Immunology* **2**, 295-300.
- FIERRO, I. M., NASCIMENTO-DASILVA, V., ARRUDA, M. A., FREITAS, M. S., PLOTKOWSKI, M. C., CUNHA, F. Q., BARJA-FIDALGO, C. (1999). Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *J Leukoc Biol* **4**, 508-14.

- FIRESTEIN, G. S. (1996). Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* **11**, 1781-90.
- FIRESTEIN, G. S., ALVARO-GRACIA, J. M., MAKI, R. (1990). Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **9**, 3347-53.
- FOSSIEZ, F., DJOSSOU, O., CHOMARAT, P., FLORES-ROMO, L., AIT-YAHIA, S., MAAT, C., PIN, J. J., GARRONE, P., GARCIA, E., SAELAND, S., BLANCHARD, D., GAILLARD, C., DAS MAHAPATRA, B., ROUVIER, E., GOLSTEIN, P., BANCHEREAU, J., LEBECQUE, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* **6**, 2593-603.
- FOWLER, A. A., 3RD, FISHER, B. J., SWEENEY, L. B., WALLACE, T. J., NATARAJAN, R., GHOSH, S. S., GHOSH, S. (1999). Nitric oxide regulates interleukin-8 gene expression in activated endothelium by inhibiting NF-kappaB binding to DNA: effects on endothelial function. *Biochem Cell Biol* **3**, 201-8.
- FRANCHI, L., PARK, J. H., SHAW, M. H., MARINA-GARCIA, N., CHEN, G., KIM, Y. G., NUNEZ, G. (2008). Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* **1**, 1-8.
- FRICKE, D., DAMERAU, B., VOGT, W. (1985). Adhesion of guinea pig polymorphonuclear leukocytes to autologous aortic strips: influence of chemotactic factors and of pharmacological agents which affect arachidonic acid metabolism. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **4**, 429-37.
- FRITZ, J. H., GIRARDIN, S. E., FITTING, C., WERTS, C., MENGIN-LECREULX, D., CAROFF, M., CAVAILLON, J. M., PHILPOTT, D. J., ADIB-CONQUY, M. (2005). Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* **8**, 2459-70.

- FRITZ, J. H., LE BOURHIS, L., SELLGE, G., MAGALHAES, J. G., FSIHI, H., KUFER, T. A., COLLINS, C., VIALA, J., FERRERO, R. L., GIRARDIN, S. E., PHILPOTT, D. J. (2007). Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* **4**, 445-59.
- GABRIEL, S. E. (2001). The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **2**, 269-81.
- GHAYUR, T., BANERJEE, S., HUGUNIN, M., BUTLER, D., HERZOG, L., CARTER, A., QUINTAL, L., SEKUT, L., TALANIAN, R., PASKIND, M., WONG, W., KAMEN, R., TRACEY, D., ALLEN, H. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* **6625**, 619-23.
- GIRARDIN, S. E., BONECA, I. G., CARNEIRO, L. A., ANTIGNAC, A., JEHANNO, M., VIALA, J., TEDIN, K., TAHA, M. K., LABIGNE, A., ZAHRINGER, U., COYLE, A. J., DISTEFANO, P. S., BERTIN, J., SANSONETTI, P. J., PHILPOTT, D. J. (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **5625**, 1584-7.
- GIRARDIN, S. E., BONECA, I. G., VIALA, J., CHAMAILLARD, M., LABIGNE, A., THOMAS, G., PHILPOTT, D. J., SANSONETTI, P. J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **11**, 8869-72.
- GLIMCHER, L. H., MURPHY, K. M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* **14**, 1693-711.
- GOLDRING, S. R., GRAVALLESE, E. M. (2002). Pathogenesis of bone lesions in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* **3**, 226-31.

- GORELIK, L., FLAVELL, R. A. (2000). Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* **2**, 171-81.
- GRACIE, J. A., FORSEY, R. J., CHAN, W. L., GILMOUR, A., LEUNG, B. P., GREER, M. R., KENNEDY, K., CARTER, R., WEI, X. Q., XU, D., FIELD, M., FOULIS, A., LIEW, F. Y., MCINNES, I. B. (1999). A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **10**, 1393-401.
- HARINGMAN, J. J., OOSTENDORP, R. L., TAK, P. P. (2005). Targeting cellular adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Emerg Drugs* **2**, 299-310.
- HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D., MANGAN, P. R., TURNER, H., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M., WEAVER, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **11**, 1123-32.
- HAYDEN, M. S., GHOSH, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**, 2195-224.
- HEINZELMANN, M., POLK, H. C., JR., CHERNOBELSKY, A., STITES, T. P., GORDON, L. E. (2000). Endotoxin and muramyl dipeptide modulate surface receptor expression on human mononuclear cells. *Immunopharmacology* **2**, 117-28.
- HIBINO, T., LOZA-COLL, M., MESSIER, C., MAJESKE, A. J., COHEN, A. H., TERWILLIGER, D. P., BUCKLEY, K. M., BROCKTON, V., NAIR, S. V., BERNEY, K., FUGMANN, S. D., ANDERSON, M. K., PANCER, Z., CAMERON, R. A., SMITH, L. C., RAST, J. P. (2006). The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol* **1**, 349-65.

- HISAMATSU, T., SUZUKI, M., REINECKER, H. C., NADEAU, W. J., MCCORMICK, B. A., PODOLSKY, D. K. (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **4**, 993-1000.
- HO, I. C., HODGE, M. R., ROONEY, J. W., GLIMCHER, L. H. (1996). The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* **7**, 973-83.
- HSU, L. C., ALI, S. R., MCGILLIVRAY, S., TSENG, P. H., MARIATHASAN, S., HUMKE, E. W., ECKMANN, L., POWELL, J. J., NIZET, V., DIXIT, V. M., KARIN, M. (2008). A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **22**, 7803-8.
- HUBER, L. C., DISTLER, O., TARNER, I., GAY, R. E., GAY, S., PAP, T. (2006). Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **6**, 669-75.
- HUTTENLOCHER, A., SANDBORG, R. R., HORWITZ, A. F. (1995). Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 697-706.
- INOHARA, CHAMAILLARD, MCDONALD, C., NUNEZ, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*, 355-83.
- INOHARA, N., DEL PESO, L., KOSEKI, T., CHEN, S., NUNEZ, G. (1998). RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **20**, 12296-300.
- INOHARA, N., KOSEKI, T., DEL PESO, L., HU, Y., YEE, C., CHEN, S., CARRIO, R., MERINO, J., LIU, D., NI, J., NUNEZ, G. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **21**, 14560-7.

- INOHARA, N., KOSEKI, T., LIN, J., DEL PESO, L., LUCAS, P. C., CHEN, F. F., OGURA, Y., NUNEZ, G. (2000). An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* **36**, 27823-31.
- INOHARA, N., NUNEZ, G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **5**, 371-82.
- INOHARA, N., OGURA, Y., FONTALBA, A., GUTIERREZ, O., PONS, F., CRESPO, J., FUKASE, K., INAMURA, S., KUSUMOTO, S., HASHIMOTO, M., FOSTER, S. J., MORAN, A. P., FERNANDEZ-LUNA, J. L., NUNEZ, G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **8**, 5509-12.
- IVANOV, II, MCKENZIE, B. S., ZHOU, L., TADOKORO, C. E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J. J., CUA, D. J., LITTMAN, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **6**, 1121-33.
- JAFFE, I. A. (1970). The treatment of rheumatoid arthritis and necrotizing vasculitis with penicillamine. *Arthritis Rheum* **4**, 436-43.
- JANEWAY, C. A., JR., MEDZHITOV, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 197-216.
- JASIN, H. E., TAUROG, J. D. (1991). Mechanisms of disruption of the articular cartilage surface in inflammation. Neutrophil elastase increases availability of collagen type II epitopes for binding with antibody on the surface of articular cartilage. *J Clin Invest* **5**, 1531-6.
- JONES, J. D., DANGL, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* **7117**, 323-9.
- JOOSTEN, L. A., HEINHUIS, B., ABDOLLAHI-ROODSAZ, S., FERWERDA, G., LEBOURHIS, L., PHILPOTT, D. J., NAHORI, M. A., POPA, C., MORRE, S. A.,



- VAN DER MEER, J. W., GIRARDIN, S. E., NETEA, M. G., VAN DEN BERG, W. B. (2008). Differential function of the NACHT-LRR (NLR) members Nod1 and Nod2 in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **26**, 9017-22.
- KHADER, S. A., BELL, G. K., PEARL, J. E., FOUNTAIN, J. J., RANGEL-MORENO, J., CILLEY, G. E., SHEN, F., EATON, S. M., GAFFEN, S. L., SWAIN, S. L., LOCKSLEY, R. M., HAYNES, L., RANDALL, T. D., COOPER, A. M. (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* **4**, 369-77.
- KIM, J. G., LEE, S. J., KAGNOFF, M. F. (2004). Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* **3**, 1487-95.
- KIM, Y. G., PARK, J. H., DAIGNAULT, S., FUKASE, K., NUNEZ, G. (2008a). Cross-tolerization between Nod1 and Nod2 signaling results in reduced refractoriness to bacterial infection in Nod2-deficient macrophages. *J Immunol* **6**, 4340-6.
- KIM, Y. G., PARK, J. H., SHAW, M. H., FRANCHI, L., INOHARA, N., NUNEZ, G. (2008b). The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity* **2**, 246-57.
- KIRKHAM, B. W., LASSERE, M. N., EDMONDS, J. P., JUHASZ, K. M., BIRD, P. A., LEE, C. S., SHNIER, R., PORTEK, I. J. (2006). Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* **4**, 1122-31.
- KLOPPENBURG, M., BREEDVELD, F. C., TERWIEL, J. P., MALLEE, C., DIJKMANS, B. A. (1994). Minocycline in active rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **5**, 629-36.

- KOBAYASHI, K., INOHARA, N., HERNANDEZ, L. D., GALAN, J. E., NUNEZ, G., JANEWAY, C. A., MEDZHITOV, R., FLAVELL, R. A. (2002). RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **6877**, 194-9.
- KOBAYASHI, K. S., CHAMAILLARD, M., OGURA, Y., HENEGARIU, O., INOHARA, N., NUNEZ, G., FLAVELL, R. A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **5710**, 731-4.
- KOLLS, J. K., LINDEN, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **4**, 467-76.
- KONG, Y. Y., FEIGE, U., SAROSI, I., BOLON, B., TAFURI, A., MORONY, S., CAPPARELLI, C., LI, J., ELLIOTT, R., MCCABE, S., WONG, T., CAMPAGNUOLO, G., MORAN, E., BOGOCH, E. R., VAN, G., NGUYEN, L. T., OHASHI, P. S., LACEY, D. L., FISH, E., BOYLE, W. J., PENNINGER, J. M. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **6759**, 304-9.
- KORN, T., BETTELLI, E., GAO, W., AWASTHI, A., JAGER, A., STROM, T. B., OUKKA, M., KUCHROO, V. K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* **7152**, 484-7.
- KRUEGER, G. G., LANGLEY, R. G., LEONARDI, C., YEILDING, N., GUZZO, C., WANG, Y., DOOLEY, L. T., LEBWOHL, M. (2007). A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* **6**, 580-92.
- KUFER, T. A., KREMMER, E., ADAM, A. C., PHILPOTT, D. J., SANSONETTI, P. J. (2008). The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell Microbiol* **2**, 477-86.
- KUIDA, K., LIPPKE, J. A., KU, G., HARDING, M. W., LIVINGSTON, D. J., SU, M. S., FLAVELL, R. A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **5206**, 2000-3.

- KULKARNI, A. B., KARLSSON, S. (1997). Inflammation and TGF beta 1: lessons from the TGF beta 1 null mouse. *Res Immunol* **7**, 453-6.
- LAMKANFI, M., KANNEGANTI, T. D., FRANCHI, L., NUNEZ, G. (2007). Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* **2**, 220-5.
- LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHN, W. M., MATTSON, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J. D., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A., CUA, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **2**, 233-40.
- LEHRER, R. I., GANZ, T., SELSTED, M. E., BABIOR, B. M., CURNUTTE, J. T. (1988). Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med* **2**, 127-42.
- LEMOES, H. P., GRESPAN, R., VIEIRA, S. M., CUNHA, T. M., VERRI, W. A., JR., FERNANDES, K. S., SOUTO, F. O., MCINNES, I. B., FERREIRA, S. H., LIEW, F. Y., CUNHA, F. Q. (2009). Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFNgamma production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **14**, 5954-9.
- LEY, K. (2002). Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev*, 8-18.
- LI, M. O., WAN, Y. Y., SANJABI, S., ROBERTSON, A. K., FLAVELL, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 99-146.
- LI, P., ALLEN, H., BANERJEE, S., FRANKLIN, S., HERZOG, L., JOHNSTON, C., MCDOWELL, J., PASKIND, M., RODMAN, L., SALFELD, J., ET AL. (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* **3**, 401-11.
- LUBBERTS, E., KOENDERS, M. I., OPPERS-WALGREEN, B., VAN DEN BERSSELAAR, L., COENEN-DE ROO, C. J., JOOSTEN, L. A., VAN DEN

- BERG, W. B. (2004). Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* **2**, 650-9.
- MACHLIN, L. J., BENDICH, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* **6**, 441-5.
- MAEDA, S., HSU, L. C., LIU, H., BANKSTON, L. A., IIMURA, M., KAGNOFF, M. F., ECKMANN, L., KARIN, M. (2005). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **5710**, 734-8.
- MALECH, H. L., GALLIN, J. I. (1987). Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* **11**, 687-94.
- MANEL, N., UNUTMAZ, D., LITTMAN, D. R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* **6**, 641-9.
- MANGAN, P. R., HARRINGTON, L. E., O'QUINN, D. B., HELMS, W. S., BULLARD, D. C., ELSON, C. O., HATTON, R. D., WAHL, S. M., SCHOEB, T. R., WEAVER, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **7090**, 231-4.
- MANTOVANI, A., DEJANA, E. (1987). Modulation of endothelial function by interleukin-1. A novel target for pharmacological intervention? *Biochem Pharmacol* **3**, 301-5.
- MARIATHASAN, S., WEISS, D. S., NEWTON, K., MCBRIDE, J., O'ROURKE, K., ROOSE-GIRMA, M., LEE, W. P., WEINRAUCH, Y., MONACK, D. M., DIXIT, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **7081**, 228-32.

- MARTINON, F., AGOSTINI, L., MEYLAN, E., TSCHOPP, J. (2004). Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol* **21**, 1929-34.
- MARTINON, F., BURNS, K., TSCHOPP, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **2**, 417-26.
- MARTINON, F., PETRILLI, V., MAYOR, A., TARDIVEL, A., TSCHOPP, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **7081**, 237-41.
- MARTINON, F., TSCHOPP, J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* **8**, 447-54.
- MARTINON, F., TSCHOPP, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* **1**, 10-22.
- MASUMOTO, J., YANG, K., VARAMBALLY, S., HASEGAWA, M., TOMLINS, S. A., QIU, S., FUJIMOTO, Y., KAWASAKI, A., FOSTER, S. J., HORIE, Y., MAK, T. W., NUNEZ, G., CHINNAIYAN, A. M., FUKASE, K., INOHARA, N. (2006). Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J Exp Med* **1**, 203-13.
- MATUSEVICIUS, D., KIVISAKK, P., HE, B., KOSTULAS, N., OZENCI, V., FREDRIKSON, S., LINK, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* **2**, 101-4.
- MCCARTHY, J. V., NI, J., DIXIT, V. M. (1998). RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* **27**, 16968-75.
- MCDONALD, C., INOHARA, N., NUNEZ, G. (2005). Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem* **21**, 20177-80.

- MCGEACHY, M. J., BAK-JENSEN, K. S., CHEN, Y., TATO, C. M., BLUMENSCHN, W., MCCLANAHAN, T., CUA, D. J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* **12**, 1390-7.
- MCINNES, I. B., LEUNG, B. P., STURROCK, R. D., FIELD, M., LIEW, F. Y. (1997). Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* **2**, 189-95.
- MCINTYRE, T. M., ZIMMERMAN, G. A., PRESCOTT, S. M. (1986). Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **7**, 2204-8.
- MCMILLAN, R. M., FOSTER, S. J. (1988). Leukotriene B4 and inflammatory disease. *Agents Actions* **1-2**, 114-9.
- MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. A., JR. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **5566**, 298-300.
- MIOSSEC, P., DINARELLO, C. A., ZIFF, M. (1986). Interleukin-1 lymphocyte chemotactic activity in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum* **4**, 461-70.
- MIOSSEC, P., KORN, T., KUCHROO, V. K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* **9**, 888-98.
- MOLET, S., HAMID, Q., DAVOINE, F., NUTKU, E., TAHA, R., PAGE, N., OLIVENSTEIN, R., ELIAS, J., CHAKIR, J. (2001). IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* **3**, 430-8.
- MOORE, A. R., IWAMURA, H., LARBRE, J. P., SCOTT, D. L., WILLOUGHBY, D. A. (1993). Cartilage degradation by polymorphonuclear leucocytes: in vitro assessment of the pathogenic mechanisms. *Ann Rheum Dis* **1**, 27-31.

- MOSMANN, T. R., COFFMAN, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 145-73.
- MURPHY, C. A., LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHN, W., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A., SEDGWICK, J. D., CUA, D. J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* **12**, 1951-7.
- NAU, G. J., RICHMOND, J. F., SCHLESINGER, A., JENNINGS, E. G., LANDER, E. S., YOUNG, R. A. (2002). Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **3**, 1503-8.
- NELL, V. P., MACHOLD, K. P., STAMM, T. A., EBERL, G., HEINZL, H., UFFMANN, M., SMOLEN, J. S., STEINER, G. (2005). Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **12**, 1731-6.
- NICHOLSON, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **11**, 1028-42.
- NURIEVA, R., YANG, X. O., MARTINEZ, G., ZHANG, Y., PANOPOULOS, A. D., MA, L., SCHLUNS, K., TIAN, Q., WATOWICH, S. S., JETTEN, A. M., DONG, C. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **7152**, 480-3.
- OGURA, Y., INOHARA, N., BENITO, A., CHEN, F. F., YAMAOKA, S., NUNEZ, G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **7**, 4812-8.
- OGURA, Y., LALA, S., XIN, W., SMITH, E., DOWDS, T. A., CHEN, F. F., ZIMMERMANN, E., TRETIKOVA, M., CHO, J. H., HART, J., GREENSON, J. K., KESHAV, S., NUNEZ, G. (2003). Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* **11**, 1591-7.

- OKAMOTO, H., YAMAMURA, M., MORITA, Y., HARADA, S., MAKINO, H., OTA, Z. (1997). The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **6**, 1096-105.
- OPPMANN, B., LESLEY, R., BLOM, B., TIMANS, J. C., XU, Y., HUNTE, B., VEGA, F., YU, N., WANG, J., SINGH, K., ZONIN, F., VAISBERG, E., CHURAKOVA, T., LIU, M., GORMAN, D., WAGNER, J., ZURAWSKI, S., LIU, Y., ABRAMS, J. S., MOORE, K. W., RENNICK, D., DE WAAL-MALEFYT, R., HANNUM, C., BAZAN, J. F., KASTELEIN, R. A. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **5**, 715-25.
- OSPELT, C., BRENTANO, F., JUNGEL, A., RENGEL, Y., KOLLING, C., MICHEL, B. A., GAY, R. E., GAY, S. (2009). Expression, regulation, and signaling of the pattern-recognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain 2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **2**, 355-63.
- PAGE, G., MIOSSEC, P. (2005). RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum* **8**, 2307-12.
- PANAYI, G. S. (2005). B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)*, ii3-ii7.
- PARK, H., LI, Z., YANG, X. O., CHANG, S. H., NURIEVA, R., WANG, Y. H., WANG, Y., HOOD, L., ZHU, Z., TIAN, Q., DONG, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **11**, 1133-41.
- PARK, J. H., KIM, Y. G., MCDONALD, C., KANNEGANTI, T. D., HASEGAWA, M., BODY-MALAPEL, M., INOHARA, N., NUNEZ, G. (2007a). RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* **4**, 2380-6.



- PARK, J. H., KIM, Y. G., SHAW, M., KANNEGANTI, T. D., FUJIMOTO, Y., FUKASE, K., INOHARA, N., NUNEZ, G. (2007b). Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol* **1**, 514-21.
- PINCUS, T., BROOKS, R. H., CALLAHAN, L. F. (1994). Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures. *Ann Intern Med* **1**, 26-34.
- PINTO, L. G., CUNHA, T. M., VIEIRA, S. M., LEMOS, H. P., VERRI-JR, W. A., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. (2009). IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice *Pain*.
- POHLERS, D., NISSLER, K., FREY, O., SIMON, J., PETROW, P. K., KINNE, R. W., BRAUER, R. (2004). Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol* **3**, 409-15.
- POLLARD, K. M., HULTMAN, P., KONO, D. H. (2003). Using single-gene deletions to identify checkpoints in the progression of systemic autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 236-9.
- POUBELLE, P. E., CHAKRAVARTI, A., FERNANDES, M. J., DOIRON, K., MARCEAU, A. A. (2007). Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther* **2**, R25.
- PUGNER, K. M., SCOTT, D. I., HOLMES, J. W., HIEKE, K. (2000). The costs of rheumatoid arthritis: an international long-term view. *Semin Arthritis Rheum* **5**, 305-20.
- RADI, Z. A., KEHRLI, M. E., JR., ACKERMANN, M. R. (2001). Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. *J Vet Intern Med* **6**, 516-29.

- RANTAPAA-DAHLQVIST, S. (2005). Diagnostic and prognostic significance of autoantibodies in early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* **2**, 83-96.
- RODRIGUEZ-PINTO, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* **2**, 67-75.
- ROSENZWEIG, H. L., JANN, M. M., GLANT, T. T., MARTIN, T. M., PLANCK, S. R., VAN EDEN, W., VAN KOOTEN, P. J., FLAVELL, R. A., KOBAYASHI, K. S., ROSENBAUM, J. T., DAVEY, M. P. (2009). Activation of nucleotide oligomerization domain 2 exacerbates a murine model of proteoglycan-induced arthritis. *J Leukoc Biol* **4**, 711-8.
- RUBANYI, G. M. (1988). Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med* **2**, 107-20.
- SAKURAI, A., OKAHASHI, N., NAKAGAWA, I., KAWABATA, S., AMANO, A., OOSHIMA, T., HAMADA, S. (2003). Streptococcus pyogenes infection induces septic arthritis with increased production of the receptor activator of the NF-kappaB ligand. *Infect Immun* **10**, 6019-26.
- SANSONETTI, P. J. (2006). The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol* **12**, 1237-42.
- SANTOS, L. L., MILENKOVSKI, G. P., HALL, P. H., LEECH, M., SHARMA, L., TAKEDA, K., AKIRA, S., KITCHING, A. R., MORAND, E. F. (2006). IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol Cell Biol* **2**, 166-73.
- SATO, K., SUEMATSU, A., OKAMOTO, K., YAMAGUCHI, A., MORISHITA, Y., KADONO, Y., TANAKA, S., KODAMA, T., AKIRA, S., IWAKURA, Y., CUA, D. J., TAKAYANAGI, H. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* **12**, 2673-82.

- SAXNE, T., PALLADINO, M. A., JR., HEINEGARD, D., TALAL, N., WOLLHEIM, F. A. (1988). Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* **8**, 1041-5.
- SCHETT, G. (2008). Review: Immune cells and mediators of inflammatory arthritis. *Autoimmunity* **3**, 224-9.
- SCHETT, G., DAVID, J. P. (2008). Denosumab--a novel strategy to prevent structural joint damage in patients with RA? *Nat Clin Pract Rheumatol* **12**, 634-5.
- SEBBA, A. (2008). Tocilizumab: the first interleukin-6-receptor inhibitor. *Am J Health Syst Pharm* **15**, 1413-8.
- SECCO, D. D., PARON, J. A., DE OLIVEIRA, S. H., FERREIRA, S. H., SILVA, J. S., CUNHA FDE, Q. (2003). Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide* **3**, 153-64.
- SHAW, M. H., REIMER, T., KIM, Y. G., NUNEZ, G. (2008). NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol* **4**, 377-82.
- SIDIROPOULOS, P. I., GOULIELMOS, G., VOLOUDAKIS, G. K., PETRAKI, E., BOUMPAS, D. T. (2008). Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. *Ann Rheum Dis* **10**, 1382-9.
- SILMAN, A. J., PEARSON, J. E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, S265-72.
- SLATER, T. F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* **1**, 1-15.
- SMOLEN, J. S., ALETAHA, D., KOELLER, M., WEISMAN, M. H., EMERY, P. (2007). New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* **9602**, 1861-74.
- SMOLEN, J. S., BREEDVELD, F. C., EBERL, G., JONES, I., LEEMING, M., WYLIE, G. L., KIRKPATRICK, J. (1995). Validity and reliability of the twenty-eight-joint

count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis Rheum* **1**, 38-43.

SMOLEN, J. S., STEINER, G. (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 473-88.

STEINER, G., SMOLEN, J. (2002). Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res*, S1-5.

STEINER, G., TOHIDAST-AKRAD, M., WITZMANN, G., VESELY, M., STUDNICKA-BENKE, A., GAL, A., KUNAVAR, M., ZENZ, P., SMOLEN, J. S. (1999). Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **3**, 202-13.

STETSON, D. B., MEDZHITOV, R. (2007). T helper 17 cells get the NOD. *Immunity* **4**, 546-8.

SUGAWARA, T., MIYAMOTO, M., TAKADA, S., NOMURA, M., KATO, M. (1995). Alteration of spleen lymphocyte populations in rats with arthritis induced by muramyl dipeptide analogue or complete adjuvant. *Int J Tissue React* **1**, 5-13.

SZABO, S. J., KIM, S. T., COSTA, G. L., ZHANG, X., FATHMAN, C. G., GLIMCHER, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **6**, 655-69.

TADA, H., AIBA, S., SHIBATA, K., OHTEKI, T., TAKADA, H. (2005). Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* **12**, 7967-76.

TAKEDA, K., AKIRA, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **1**, 1-14.

- TANABE, T., CHAMAILLARD, M., OGURA, Y., ZHU, L., QIU, S., MASUMOTO, J., GHOSH, P., MORAN, A., PREDERGAST, M. M., TROMP, G., WILLIAMS, C. J., INOHARA, N., NUNEZ, G. (2004). Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *Embo J* **7**, 1587-97.
- THORNBERRY, N. A., BULL, H. G., CALAYCAY, J. R., CHAPMAN, K. T., HOWARD, A. D., KOSTURA, M. J., MILLER, D. K., MOLINEAUX, S. M., WEIDNER, J. R., AUNINS, J., ET AL. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **6372**, 768-74.
- TODATE, A., SUDA, T., KUWATA, H., CHIDA, K., NAKAMURA, H. (2001). Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol* **5**, 723-9.
- TOIVANEN, P. (2001). From reactive arthritis to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* **3**, 369-71.
- TRAVASSOS, L. H., CARNEIRO, L. A., GIRARDIN, S. E., BONECA, I. G., LEMOS, R., BOZZA, M. T., DOMINGUES, R. C., COYLE, A. J., BERTIN, J., PHILPOTT, D. J., PLOTKOWSKI, M. C. (2005). Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **44**, 36714-8.
- UEHARA, A., FUJIMOTO, Y., FUKASE, K., TAKADA, H. (2007). Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* **12**, 3100-11.
- UEHARA, A., SUGAWARA, Y., KURATA, S., FUJIMOTO, Y., FUKASE, K., KUSUMOTO, S., SATTA, Y., SASANO, T., SUGAWARA, S., TAKADA, H. (2005). Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. *Cell Microbiol* **5**, 675-86.

- UEMATSU, S., AKIRA, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem* **21**, 15319-23.
- VAN BEELEN, A. J., ZELINKOVA, Z., TAANMAN-KUETER, E. W., MULLER, F. J., HOMMES, D. W., ZAAT, S. A., KAPSENBERG, M. L., DE JONG, E. C. (2007). Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* **4**, 660-9.
- VAN DER HEIJDE, D. M., VAN RIEL, P. L., NUVER-ZWART, I. H., GRIBNAU, F. W., VAD DE PUTTE, L. B. (1989). Effects of hydroxychloroquine and sulphasalazine on progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Lancet* **8646**, 1036-8.
- VELDHOEN, M., HOCKING, R. J., ATKINS, C. J., LOCKSLEY, R. M., STOCKINGER, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **2**, 179-89.
- VOSS, E., WEHKAMP, J., WEHKAMP, K., STANGE, E. F., SCHRODER, J. M., HARDER, J. (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* **4**, 2005-11.
- WAHL, S. M., CHEN, W. (2003). TGF-beta: how tolerant can it be? *Immunol Res* **3**, 167-79.
- WELTER-STAHN, L., OJCIUS, D. M., VIALA, J., GIRARDIN, S., LIU, W., DELARBRE, C., PHILPOTT, D., KELLY, K. A., DARVILLE, T. (2006). Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell Microbiol* **6**, 1047-57.
- WERTS, C., LE BOURHIS, L., LIU, J., MAGALHAES, J. G., CARNEIRO, L. A., FRITZ, J. H., STOCKINGER, S., BALLOY, V., CHIGNARD, M., DECKER, T.,

- PHILPOTT, D. J., MA, X., GIRARDIN, S. E. (2007). Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol* **9**, 2499-508.
- WILSON, N. J., BONIFACE, K., CHAN, J. R., MCKENZIE, B. S., BLUMENSCHN, W. M., MATTSON, J. D., BASHAM, B., SMITH, K., CHEN, T., MOREL, F., LECRON, J. C., KASTELEIN, R. A., CUA, D. J., MCCLANAHAN, T. K., BOWMAN, E. P., DE WAAL MALEFYT, R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* **9**, 950-7.
- WOLFE, F., HAWLEY, D. J. (1998). The longterm outcomes of rheumatoid arthritis: Work disability: a prospective 18 year study of 823 patients. *J Rheumatol* **11**, 2108-17.
- WONG, B. R., JOSIEN, R., LEE, S. Y., SAUTER, B., LI, H. L., STEINMAN, R. M., CHOI, Y. (1997). TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* **12**, 2075-80.
- YAMIN, T. T., AYALA, J. M., MILLER, D. K. (1996). Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *J Biol Chem* **22**, 13273-82.
- YANG, L., ANDERSON, D. E., BAECHER-ALLAN, C., HASTINGS, W. D., BETTELLI, E., OUKKA, M., KUCHROO, V. K., HAFLER, D. A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* **7202**, 350-2.
- YANG, X. O., PANOPOULOS, A. D., NURIEVA, R., CHANG, S. H., WANG, D., WATOWICH, S. S., DONG, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* **13**, 9358-63.
- YANG, X. O., PAPPU, B. P., NURIEVA, R., AKIMZHANOV, A., KANG, H. S., CHUNG, Y., MA, L., SHAH, B., PANOPOULOS, A. D., SCHLUNS, K. S., WATOWICH, S. S., TIAN, Q., JETTEN, A. M., DONG, C. (2008). T helper 17

lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* **1**, 29-39.

YAO, Z., FANSLOW, W. C., SELDIN, M. F., ROUSSEAU, A. M., PAINTER, S. L., COMEAU, M. R., COHEN, J. I., SPRIGGS, M. K. (1995). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* **6**, 811-21.

YELIN, E., WANKE, L. A. (1999). An assessment of the annual and long-term direct costs of rheumatoid arthritis: the impact of poor function and functional decline. *Arthritis Rheum* **6**, 1209-18.

ZHANG, F., MENG, G., STROBER, W. (2008). Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* **11**, 1297-306.

ZHENG, W., FLAVELL, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **4**, 587-96.

ZHOU, L., IVANOV, II, SPOLSKI, R., MIN, R., SHENDEROV, K., EGAWA, T., LEVY, D. E., LEONARD, W. J., LITTMAN, D. R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* **9**, 967-74.

ZHOU, L., LOPES, J. E., CHONG, M. M., IVANOV, II, MIN, R., VICTORA, G. D., SHEN, Y., DU, J., RUBTSOV, Y. P., RUDENSKY, A. Y., ZIEGLER, S. F., LITTMAN, D. R. (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* **7192**, 236-40.

ZILBAUER, M., DORRELL, N., ELMI, A., LINDLEY, K. J., SCHULLER, S., JONES, H. E., KLEIN, N. J., NUNEZ, G., WREN, B. W., BAJAJ-ELLIOTT, M. (2007). A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol* **10**, 2404-16.



ZIMMERMANN, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **2**, 109-10.

ZWERINA, J., REDLICH, K., SCHETT, G., SMOLEN, J. S. (2005). Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci*, 716-29.

***Anexos***

**Tabela 2.** Primers usados para o Real-Time RT-PCR

| Humano         |                                 |                                 |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|
| GENE           | FOWARD (5' – 3')                | REVERSE (5' – 3')               |
| GAPDH          | ATC ACC ATC TTC CAG GAG         | ATG GAC TGT GGT CAT GAG         |
| NOD1           | CAG CAC TTT CCC ATG TAT TGA T   | TCA AAT CCC ACA CTG CAC A       |
| NOD2           | GGT TGA TGC CTG TGA ACT GAA     | AAA TGA AAT GGA ACT GCC TCT T   |
| RIPK2          | ACA TGC CAA ATG GAT CAT TAA     | CAA TGG CCA AGC AAC ATC         |
| IL-6           | GCC TTC GGT CCA GTT GCC TT      | GCA GAA TGA GAT GAG TTG TC      |
| IL-23 p19      | CTG ATA GCC CTG TGG GCC AG      | GCT GCC TTT AGG GAC TCA GG      |
| IL-1 $\beta$   | GCA ATG AGG ATG ACT TGT TCT TTG | CAG AGG TCC AGG TCC TGG AA      |
| Murino         |                                 |                                 |
| GENE           | FOWARD (5' – 3')                | REVERSE (5' – 3')               |
| $\beta$ -actin | AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT      | AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT      |
| NOD1           | GGA CAA CTT GCT GGA GAA T       | CTG CAG CAC GTA GAG GAA         |
| NOD2           | CTT CAT TTG GCT CAT CCG TAG     | CTG GAG ATG TTG CAG TAC AAA G   |
| IL-6           | AAC GAT GAT GCA CTT GCA GA      | GAG CAT TGG AAA TTG GGG TA      |
| IL-23 p19      | AAC AGA TGC CCA GCC TGA CTT CTA | AGG CCA ACC GCT CGA GAC TTT ATT |
| RANKL          | CCA AGA TCT CTA ACA TGA CG      | CAC CAT CAG CTG AAG ATA GT      |



Silvio - f225

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 127/2008, sobre o projeto intitulado “*Papel dos receptores NOD-Like (NLR) na artrite induzida por antígeno (AIA) e na encefalomielite autoimune experimental (EAE)*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Fernando de Queiróz Cunha** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **29 de setembro de 2008**.

(We certify that the protocol nº 127/2008, about “*Role of NOD-Like (NLRs) receptors in antigen induced arthritis (AIA) and encephalomyelitis autoimmune experimental (EAE)*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 09/29/2008 meeting).

Ribeirão Preto, 29 de setembro de 2008.



**Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal

**NOD2/RIPK2/caspase-1 pathway regulates a T<sub>H</sub>17-dependent response that  
contributes to the development of arthritis**

**Silvio M Vieira<sup>1,4</sup>, Thiago M Cunha<sup>1</sup>, Larissa G Pinto<sup>1</sup>, Henrique P Lemos<sup>1</sup>, Jonilson B  
Lima<sup>2</sup>, Rafaela BM Guimarães<sup>1</sup>, Waldiceu A Verri Jr.<sup>1</sup>, Sérgio CL Almeida<sup>3</sup>, Fabiola R  
Oliveira<sup>3</sup>, Paulo Louzada-Jr<sup>3</sup>, Sergio H Ferreira<sup>1</sup>, Dario S Zamboni<sup>2\*</sup>, and Fernando Q  
Cunha<sup>1\*</sup>**

Departments of <sup>1</sup>Pharmacology and <sup>2</sup>Cell Biology and <sup>3</sup>Division of Clinical Immunology of  
the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Laboratory of  
Pharmacology, National Institute for Research in the Amazon (INPA), Manaus, Brazil

**\*Corresponding Authors**

Prof. Fernando Queiróz Cunha<sup>1</sup> and Dario Simões Zamboni<sup>2</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pharmacology and <sup>2</sup>Cell Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão  
Preto, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São  
Paulo 14049-900, Brazil. Tel: 55 16 36023223, Fax: 55 16 36332301 Email:

[fdqcunha@fmrp.usp.br](mailto:fdqcunha@fmrp.usp.br) or [dszamboni@fmrp.usp.br](mailto:dszamboni@fmrp.usp.br)

**Keywords:** NOD2, arthritis, T<sub>H</sub>17, proteoglycan, chemokines, cytokines, leukocytes.

**Running title:** NOD2 receptor-mediates inflammatory response in arthritis

**Total character count:** 21,806

## ABSTRACT

Intracellular pattern recognition receptors such as the NLRs family members are key for innate immune recognition of microbial infection and may play important roles in the development of inflammatory diseases, including rheumatic diseases. Here, we show that expression and activity of NOD2, but not NOD1, are augmented in SPBMCs from RA compared with OA patients. NOD2 overexpression and increased activation were also observed in synovial tissues recovered from mice that developed an adaptive immune experimental arthritis. *NOD2*<sup>-/-</sup>, but not *NOD1*<sup>-/-</sup> mice are protected from antigen-induced arthritis, which is characterized by a reduction in inflammatory events including neutrophil recruitment, nociception and cartilage degradation. NOD2 signaling triggers T<sub>H</sub>17 immune response into the joint by managing the production of IL-6, IL-23, IL-1 $\beta$  and IL-17. These NOD2-dependent mechanisms appear to be dependent on the activation of RIPK2 and caspase-1. Together, these findings point to a pivotal role of the NOD2 in the onset of RA. Therefore, NOD2 signaling is a clinical target for the development of new therapies for the control of rheumatoid arthritis.

---

Abbreviations: NLRs, NOD-like receptors; NOD1 and 2, nucleotide binding oligomerization domain 1 and 2; RIPK, RIP-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein kinase; RA, rheumatoid arthritis; OA, osteoarthritis; SPBMCs, synovial and peripheral blood mononuclear cells; AIA, antigen-induced arthritis; mBSA, methylated bovine serum albumin.

## INTRODUCTION

Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) are a family of intracellular microbial sensors that are proposed to survey the cytoplasm for the presence of microbial invaders and endogenous danger signals. It is currently widely accepted that NLR proteins are critical for the regulation of the innate immune response and therefore play a critical role in host defense against intracellular pathogens (Inohara, et al., 2001, Ogura, et al., 2001).

NOD1 and NOD2 were the first members of the family to be described and are the most well-studied (Inohara, et al., 2001, Ogura, et al., 2001). While NOD1 is ubiquitously expressed, NOD2 expression is restricted to monocytes, macrophages, dendritic cells, and intestinal Paneth cells (Inohara, et al., 2005). Initial biochemical characterization of NOD1 and NOD2 revealed that both induce NF- $\kappa$ B activation in a Toll-like receptor-independent fashion (Inohara, et al., 2001). Subsequent analysis demonstrated that NOD1 and NOD2 recognize different structural core motifs derived from bacterial peptidoglycan (PGN). NOD1 activity is triggered by *meso*-DAP, which is unique to PGN structures from all Gram-negative bacteria and certain Gram-positive bacteria, including *Listeria* and *Bacillus* (Girardin, et al., 2003a). In contrast, NOD2 is activated by muramyl dipeptide (MDP), a peptidoglycan motif present in all Gram-positive and Gram-negative bacteria (Girardin, et al., 2003b). Upon ligand recognition, NOD1 and NOD2 undergo conformational changes and self-oligomerization. This is followed by the recruitment and activation of the serine/threonine kinase RIPK2 (RICK/RIP2), which is essential for the activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs (Inohara, et al., 2000, Park, et al., 2007).

In addition to activating NF- $\kappa$ B and MAPK, NLRs are also involved in the formation of the so-called 'inflammasome'. The inflammasome is a molecular

platform composed of caspase-1 and at least one NLR protein. Although the roles of NLRP3 and NLRC4 in the inflammasome are well described, the role of NOD1 and NOD2 in the inflammasome is not yet clear. Additionally, the influence of NOD in the activation of caspase-1, which is required for the processing and maturation of the proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-18 (Martinon, et al., 2002) is not currently known.

Despite their undisputed importance in host defense, definitive biological roles for most NLRs are as yet unknown. A recent study showed that NOD1 and NOD2 are expressed in the synovium of rheumatoid arthritis (RA) patients, and activation of these receptors leads to the production of proinflammatory mediators by synovial cells (Joosten, et al., 2008, Ospelt, et al., 2009). This evidence suggests that the activation of NLRs expressed in joint tissue might contribute to the initiation, amplification and even to the progression of the inflammatory response in RA by sensing products of pathogens or damaged cells or endogenous substances found in arthritic joints. In this context, it was recently demonstrated that joint inflammation induced by bacterial products is reduced in genetically deficient NOD2 mice (Joosten, et al., 2008). In the present study, we investigated the involvement and the role of NLR (NOD1 and NOD2) in the genesis of RA using both an experimental model of this disease (antigen-induced arthritis in mice; AIA) and cells from RA patients. Our results show that NOD2, but not NOD1, regulates the induction of arthritis in mice and is upregulated in cells derived from RA patients in comparison to control cells. Moreover, NOD2 signaling triggers T<sub>H</sub>17 immune response into the joint by a mechanism dependent on the activation of RIPK2 and caspase-1.



## RESULTS AND DISCUSSION

### *NOD2, but not NOD1, is involved in the pathogenesis of arthritis*

The NLRs play key roles in the initiation of innate immune response to pathogens-derived molecules or endogenous metabolites of damaged cells (Sidiropoulos, et al., 2008). The presence of NOD1 and NOD2 in the synovial membrane of RA patients suggests that they could potentially be involved in the initiation, amplification and progression of the inflammatory response in rheumatic diseases (Ospelt, et al., 2009). In the present study, this hypothesis was investigated both in RA-derived immune cells and also in a surrogate model of this disease. Initially, we observed that mRNA expression of NOD2 is upregulated in the synovial liquid and circulating white cells of RA patients compared with cells from osteoarthritis (OA) (Fig. 1 A). NOD1 mRNA expression was not significantly different between these patients (Fig. 1 B).

Recent data has demonstrated that NOD2 is functional within the mouse joints (Rosenzweig, et al., 2009). For instance, systemic or local (intraarticular) administration of MDP, a NOD2 agonist, peptidoglycan (PGN) or *Streptococcus pyogenes* cell wall fragments results in significant NOD2-dependent joint inflammation (Joosten, et al., 2008, Rosenzweig, et al., 2009). It is important to mention that these arthritic models are generated by administration of bacterial components and are triggered mainly by mechanisms related to innate immunity. In order to examine the involvement of NOD2 in adaptive immune inflammation, we used a model of arthritis induced by methylated bovine serum albumin (mBSA) as an antigen in previously immunized mice. The mBSA-induced arthritis mouse model is a suitable and reproducible experimental system that exhibits several features with

histopathological findings similar to those observed in human RA, including cartilage degradation (Brackertz, et al., 1977). In this model, the adaptive immune response is dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and to a lesser extent is mediated by serum antibody (Pohlers, et al., 2004). Therefore, we used this model to explore the role of NOD1 and NOD2 in the pathogenesis of arthritis. We first evaluated the expression of mRNA of NOD1 and NOD2 in the synovial membrane after mBSA joint challenge. High levels of NOD1 expression were observed in synovial membranes of WT immunized mice in comparison to naïve mice (Fig. 2 A); however, levels were not significantly changed after the mBSA challenge. In contrast, the expression of mRNA for NOD2 only appears elevated after the mBSA-challenge in immunized mice (Fig. 2 A).

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disorder characterized by leukocyte recruitment, pain and progressive destruction of joints, resulting in disability (Smolen, et al., 2007). A previous report from our laboratory demonstrated that AIA is characterized by an early massive infiltration of neutrophils in the joint cavity and also by an intense mechanical nociception, measured by a decrease in the mechanical nociceptive threshold (Pinto, et al., 2009). Here, it was observed that 24 h after mBSA challenge in the knee joints of WT and *NOD1*<sup>-/-</sup> immunized mice there was a prominent joint neutrophil infiltration and mechanical hypernociception. Both events were not observed in *NOD2*<sup>-/-</sup> immunized mice (Fig. 2 B and C). In addition to leukocyte recruitment and pain, the erosion of articular cartilage caused by extracellular matrix breakdown is also a hallmark of arthritis (Huber, et al., 2006). In an attempt to evaluate the cartilage erosion in mBSA-induced arthritis, we quantified the levels of proteoglycan in the joints of mice seven days after a second challenge with mBSA. In this set of experiments, we observed that WT and *NOD1*<sup>-/-</sup> mice exhibited significantly lower proteoglycan levels compared with control mice,

whereas this proteoglycan reduction was not observed in *NOD2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2 D). These results can be directly visualized by histopathological analysis in safranin-stained cartilage slices (Fig. 2 E). The decrease in the joint inflammatory parameters in *NOD2*<sup>-/-</sup> mice was associated with a reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , and the KC/CXCL1 chemokine (Fig. 2 F and G). On the other hand, the production of these cytokines in *NOD1*<sup>-/-</sup> mice was not different from WT mice (Fig. 2 F and G).

One intriguing finding is the fact that NOD2 deficient mouse-derived lymph node cells exhibit normal production of IL-2 and a normal proliferation response when stimulated by the specific antigen (mBSA) or by a non-specific stimulus (ConA); the production of specific IgG against antigen (mBSA) was also normal (Supplemental data 1 A – C). Therefore, under these experimental conditions, the reduced inflammatory response in NOD2 deficient mice is not related to the immunization process and constituents of CFA (adjuvant) do not activate NOD2. These results suggest that the role of NOD2 in arthritis might involve events triggered locally in the joints after mBSA challenge.

### ***Cytokines that promote $T_H17$ -differentiation are coordinated by NOD2***

The inevitable question that emerges from these findings is: how does the NOD2 receptor modulate the joint inflammatory response? The inflammatory events of RA are primarily mediated by cytokines and chemokines. The current hypothesis is that the  $T_H17$ -derived cytokine IL-17 plays a pivotal role in the pathophysiology of RA (Chabaud, et al., 1999). This hypothesis is supported by studies that have shown that pharmacological or genetic inhibition of IL-17 production or activity attenuates the

events of experimental RA, such as leukocyte migration, osteoclast activation, and cartilage and bone erosion (Lubberts, et al., 2004). We detected high levels of IL-17 in the joint cavities of WT and *NOD1*<sup>-/-</sup> arthritic mice, and levels were remarkably reduced in *NOD2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3 A). These data point to the involvement of NOD2 in the modulation of the T<sub>H</sub>17 type response.

Although data from the literature suggests that T<sub>H</sub>17 cell differentiation is initiated in draining lymph nodes and these cells are recruited to the inflamed focus, recent evidence suggests that IL-17-producing cells may be locally generated in the synovium in response to local cytokines produced by inflammatory macrophages (Egan, et al., 2008). In agreement with this hypothesis and with our suggestion that NOD2 might play a role in the local genesis of the IL-17 immune response, we observed that mRNA expression levels of crucial cytokines that instruct and drive T<sub>H</sub>17 cell fate, such as IL-6 and IL-23, and also the levels of IL-1 $\beta$  (Fig. 3 B – D) are strongly reduced in the synovium of NOD2 null mice compared with wild type or *NOD1*<sup>-/-</sup> mice. Therefore, joint activation of NOD2 in Ag-presenting cells may trigger the production of these cytokines, favoring the T<sub>H</sub>17 response. This hypothesis is also supported by recent data showing that the activation of NOD2 in human dendritic cells leads to an enhancement of IL-17 production by memory T cells in an IL-23 and IL-1 $\beta$  dependent manner (van Beelen, et al., 2007). In clinical samples, we observed that in the same samples from synovial-and blood-mononuclear cells of RA patients that present increased expression of NOD2, the mRNA expression of IL-6, IL-23 and IL-1 $\beta$  was also elevated in comparison with OA (Fig. 3 E – G).

### ***The NOD2 effector RIPK2 participates in arthritis***

RIPK2 is a ubiquitously expressed serine/threonine kinase originally associated with induction of apoptosis (Inohara, et al., 1998, McCarthy, et al., 1998). Interestingly, recent data demonstrated that RIPK2 is a key effector molecule downstream of NOD1 and NOD2, but not downstream of TLRs. Indeed, NOD signaling is impaired in macrophages from RIPK2-deficient mice (Park, et al., 2007). To address the participation of RIPK2 in the inflammatory process of arthritis, its expression levels were analyzed by real-time RT-PCR in synovial and systemic mononuclear cells from RA and OA patients. As shown in Figure 4A, high levels of RIPK2 mRNA were observed in cells from RA patients in comparison with control OA. Therefore, we analyzed whether RIPK2 participates in mBSA-induced arthritis. The i.a. injection of mBSA in WT immunized mice induced neutrophil migration and mechanical hypernociception that was reduced in *RIPK2*<sup>-/-</sup> immunized mice (Fig. 4 B and C). Furthermore, the mBSA challenge did not promote cartilage erosion in *RIPK2*<sup>-/-</sup> mice that was observed in WT mice (Fig. 3 D).

As with NOD2, RIPK2 also seems to be involved in triggering the IL-17 immune response. The level of IL-17 was reduced in *RIPK2*<sup>-/-</sup> mice induced by mBSA in immunized mice (Fig. 4 E). Although the molecular mechanism by which activation of RIPK2 signaling stimulates the IL-17 immune response was not determined, there is evidence indicating that RIPK2 is the critical step between NOD2 and NF-κB activation, which may induce IL-17 promoting cytokines such as IL-23 and IL-6 (Brown, et al., 2008).

The decrease in the joint inflammatory parameters in *RIPK2*<sup>-/-</sup> mice was also associated with a reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines including

TNF- $\alpha$  and KC/CXCL1 chemokine, but not IL-1 $\beta$  (Fig. 3 F – H). It is noteworthy that these last findings are also in line with the data showing that IL-17 is critical in stimulating the release of TNF- $\alpha$  and chemokines by joint structural and resident cells during arthritis (Lemos, et al., 2009).

### ***NOD2/caspase-1 signaling modulates joint inflammation in RA***

The observations that the decreased inflammatory parameters such as neutrophil migration in RIPK2 null mice was less pronounced when compared with NOD2 deficient mice and that IL-1 $\beta$  production was not reduced in these null mice suggests that other signaling pathways might be acting downstream of NOD2. Caspase-1 activation downstream of NOD2 is a likely candidate pathway (Maeda, et al., 2005). It has been shown that activation of NOD2 signaling may directly or indirectly contribute to inflammasome assembly and caspase-1 activation (Stetson and Medzhitov, 2007). Therefore, we investigated the role of caspase-1 in the pathogenesis of AIA. The massive neutrophil infiltration and intense hypernociception observed 24 h after mBSA challenge in the knee joints of WT immunized mice were not observed in immunized *caspase-1*-deficient mice (Fig. 5 A and B). Furthermore, *caspase-1*<sup>-/-</sup> mice also show reduced loss of proteoglycan in the joints after mBSA challenge (Fig. 5 C), which was confirmed by histopathological analysis in safranin-stained cartilage (Fig. 5 D). Caspase-1 seems to play a crucial role in the inflammatory response by processing pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 to active forms of these cytokines (Martinon, et al., 2002). Recent data showed that IL-18 null mice are not protected from mBSA-induced arthritis (Santos, et al., 2006), suggesting that IL-1 $\beta$  might be the caspase-1 downstream mechanism. To further gain insight into the

mechanisms by which the NOD2/caspase-1 pathway participates in AIA, here we observed that, as in NOD2, the local production of IL-1 $\beta$  is reduced in *caspase-1*<sup>-/-</sup> mice with experimental arthritis (Fig. 5 E). Furthermore, we found that the treatment of mice with IL-1ra ameliorates AIA as shown by the reduction in neutrophil migration, hypernociception, and cartilage erosion (Supplemental data 2 A – C). In arthritic joints, NOD2/caspase-1-dependent secretion of IL-1 $\beta$  may mediate several pro-inflammatory events, but it might also amplify the immune inflammatory response through favoring the IL-17-driven response as discussed above. In this context, the level of IL-17 was reduced in *caspase-1*<sup>-/-</sup> mice compared with WT immunized mice after mBSA challenge (Fig. 5 F).

The putative NOD2/caspase-1 signaling mechanism observed in experimental arthritis was also tested in cells from RA patients. Besides the observation that components of the NOD2 signaling pathway have increased expression levels in joint tissue and cells from RA, NOD2 activity is also increased. MDP, a selective NOD2 ligand, induced caspase-1 activation (Fig. 6 A) and the release of IL-1 $\beta$  (Fig. 6 B) in PBMCs from RA patients, but not from OA patients. Taken together, these results further strengthen the connection between NOD2 and caspase-1 and corroborate with the importance of IL-1 $\beta$  in rheumatoid arthritis. It is important to mention that, contrary to our findings, it was recently demonstrated that mBSA injected in the joints of *caspase-1*<sup>-/-</sup> mice induces similar edema and leukocyte infiltration that was observed in wild type mice (Kolly, et al., 2009). Although the explanation for the discrepancy between these results and ours is not immediately apparent, one possible explanation is that they used a supramaximal dose of antigen (10-fold higher than that used in the present study), which could be difficult to modulate.

An important question that arose from our data is how is the NOD2 signaling pathway activated in the context of human arthritic joints? Although future studies are necessary to answer this question, it was recently found that a high concentration of NOD2 ligand (MDP fragments) exists in the synovial tissue of RA patients (Joosten, et al., 2008). This hypothesis is in agreement with the idea that infections are implicated in the aggravation of RA. However, it is important to note that NOD2 would also recognize products from damaged cells and endogenous metabolites as observed with others NLR (Sidiropoulos, et al., 2008). Further investigations and manipulations of NOD2 signaling may improve therapeutic options for RA patients.

## **CONCLUDING REMARKS**

The major findings of this work underline the importance of NOD signaling in the pathogenesis of arthritis. NOD2 appears to have at least two main functions in triggering the cascade of events in the inflammatory arthritis: (1) its signaling via RIPK2 that in turn mediates the development of arthritis, and (2) NOD2 may also play a role in caspase-1 activation. These pathways contribute to NOD2 triggering the IL-17 immune response by managing the local production of IL-6, IL-23 and IL-1 $\beta$ . Together, these events cooperate to promote joint inflammation. Our results suggest that NOD2 signaling constitutes a real research target for development of new therapeutics for the control of arthritis immune inflammation.



## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Wild-type (WT) C57BL/6, *NOD1*<sup>-/-</sup>, *NOD2*<sup>-/-</sup>, *caspase-1*<sup>-/-</sup> and *RIPK2*<sup>-/-</sup> (Chin, et al., 2002, Kobayashi, et al., 2002, Kobayashi, et al., 2005, Kuida, et al., 1995, Li, et al., 1995) mice were used in this study. All knockout mice were generous gifts from Dr. Richard A. Flavell (Yale University School of Medicine) and were maintained in the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil). All experiments were conducted according to the guidelines of the Ethics Committee of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

### *Patients and cell separation*

Synovial fluid and peripheral blood samples from patients with RA and OA were collected during joint treatment. Patients provided written consent before the procedure. All RA patients fulfilled the American College of Rheumatology (formerly the American Rheumatism Association) criteria for the classification of RA (Arnett, et al., 1988). Four patients were under treatment with methotrexate (MTX) alone, and nine patients were under treatment with MTX plus anti-TNF (infliximab) (clinical information is shown in Supplemental Table I). According to the disease activity score 28 (DAS28, Prevoo et al, 1995), patients treated with MTX plus anti-TNF exhibited lower levels of DAS28 (mean = 3.8) compared to those treated with MTX alone (DAS28: mean = 5.1). RA patients that received anti-TNF therapy presented a reduction of at least 1.3 in the DAS28 score indicating the beneficial effect of anti-TNF therapy. OA was diagnosed according to clinical findings. For cell culture and RNA extraction, the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated on

a Ficoll-Paque plus density gradient (GE Healthcare Lifesciences). Total cells from joint synovial fluid were used as described below for RNA extraction and real-time PCR assays.

#### *Induction of experimental arthritis and neutrophil migration evaluation*

C57BL/6 and knockout mice were sensitized as previously described (Vieira, et al., 2009). Arthritis was induced in the immunized animals 21 days after the initial injection by intraarticular injection of mBSA dissolved in 10  $\mu$ L phosphate buffered saline (PBS). Sham-immunized and immunized mice were challenged with mBSA or with PBS. Mice were killed 24 h after intraarticular injections, and neutrophil migration was determined as previously described (Pinto, et al., 2009) for total and differential cell counts. Results were expressed as the number of neutrophils per cavity.

#### *Mechanical hypernociceptive test*

The term hypernociception rather than hyperalgesia or allodynia is used to define the decrease of the nociceptive withdrawal threshold in animal models. Mechanical articular hypernociception was evaluated as previously described by Pinto *et al.* (2009).

#### *Proteoglycan quantification assay*

Proteoglycan contents were determined using the method described by Burkhardt *et al.* with modifications (Burkhardt, et al., 2001). Briefly, patella were carefully collected from each animal and fixed with formaldehyde (4%) overnight using a shaker. They were then transferred into a solution of formic acid (5%) and incubated

for 4 h using a shaker for decalcification. Each patella was then placed into 100  $\mu$ L papain digestion buffer consisting of a papain suspension (5 mg/mL) in calcium and magnesium free phosphate buffered saline with 5 mM cysteine and 10 mM EDTA, pH 7.4. The samples were sealed and incubated in a humidified container in a 60°C oven for 16 h. After reaching room temperature the samples were centrifuged for 10 min at 1000  $\times g$  to collect the condensation droplets. Next, 50  $\mu$ L of the supernatants and of serial chondroitin sulfate solutions (STD curve; 50-1000  $\mu$ g/ml) were placed into 96-well microtiter plates. The chondroitin sulfate STD solutions were also incubated with papain digestion buffer. Then, 300  $\mu$ L of a 1,9-dimethylmethylen blue (DMMB; 50 mg/L) solution was added to each well and the absorbance at 525 nm was measured immediately in a plate reader. The GAG content was calculated from the standard curve. The DMMB solution was prepared by dissolving 50 mg DMMB in 5 ml ethanol and diluting to a volume of 1000 mL with 0.2% (w/v) sodium formate buffer, pH 3.5. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

### *Histological Analysis*

Whole knee joints were removed and fixed in 4% formaldehyde for five days before decalcification in 5% formic acid and processing for paraffin embedding. Tissue sections (7  $\mu$ m) were stained either with Safranin-O (cartilage PG loss). PG depletion was scored in the Safranin O-stained slides on a scale from 0 to 100, ranging from stained cartilage to fully destained cartilage. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

### *Real-time PCR quantitative*

*For mice:* Three hours after mBSA injection, mice were terminally anesthetized and the synovial membrane was collected. *For patients:* PBMCs and total cells from synovial fluid were used as described above. All the samples were collected and total RNA, reverse transcription and quantitative real-time RT-PCR was performed as previously described (Vieira, et al., 2009). Data were analyzed with the comparative cycle threshold (CT) method. Primer pairs for mouse  $\beta$ -actin, NOD1, NOD2, IL-6, IL-23 and human GAPDH, NOD1, NOD2, RIPK2, IL-6, IL-23 and IL-1 $\beta$  were as shown in Supplemental Table II.

#### *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Levels of IL-2, IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC at 3 and 12 h after injection of mBSA were quantified in the joint tissues of immunized or non-immunized mice and PBS-injected immunized mice by ELISA. Briefly, joints were dissected out, frozen with liquid nitrogen, crushed in a mortar and pestle, then solubilized in PBS and measured using ELISA (Taktak and Lee, 1991), with the results expressed as picograms per milliliter. Patient PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells) were cultured with RPMI, FK156 (10  $\mu$ g/mL; Astellas Pharma Inc.) or MDP (100  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich) for 24 h, then centrifuged and the supernatants collected for ELISA detection of IL-1 $\beta$  with the results expressed as picograms per milliliter.

#### *Caspase-1 activation assay*

Caspase-1 activation assay was performed as previously described (Zamboni, et al., 2006). PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells) from OA or AR patients were seeded in 24-well plates and stimulated with RPMI, FK156 (10  $\mu$ g/mL) or MDP (100  $\mu$ g/mL) for 24 h. After stimulation, cells were incubated with a Flica Probe (FAM-YVAD-FMK Caspase-1

FLICA™ Immunochemistry Technologies, LLC) for 1 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, washed 5 times with PBS-1% FBS and analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto™).

#### *Proliferation and IgG assay*

The proliferation and IgG assays were performed as previously described (Cunha, et al., 2008, Kolly, et al., 2009). Lymph node cells from WT or knockout mice were cultured at  $5 \times 10^5$  cells/well.

#### *Statistical analysis*

The data are reported as means  $\pm$  SEM and are representative of two or three independent experiments. The means from different treatments were compared by analysis of variance (ANOVA). When statistical significances were identified, individual comparisons were subsequently tested with Bonferroni's *t* test for unpaired values. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Giuliana B Francisco, Ieda RS Schivo, Fabiola Leslie A Mestriner, Sérgio R Rosa, Ana K dos Santos and Cristiane Maria Milanezi for technical assistance. This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM (Brazil), Conselho Nacional de Pesquisa (Brazil) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brazil). SM Vieira is a recipient of a fellowship from FAPEAM.

The authors have no conflicting financial interests.

## REFERENCES

- Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., and et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-324.
- Brackertz, D., Mitchell, G.F., Vadas, M.A., Mackay, I.R., and Miller, J.F. 1977. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol.* 118:1639-1644.
- Brown, K.D., Claudio, E., and Siebenlist, U. 2008. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 10:212.
- Burkhardt, D., Hwa, S.Y., and Ghosh, P. 2001. A novel microassay for the quantitation of the sulfated glycosaminoglycan content of histological sections: its application to determine the effects of Diacerhein on cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 9:238-247.
- Chabaud, M., Durand, J.M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L., and Miossec, P. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 42:963-970.
- Chin, A.I., Dempsey, P.W., Bruhn, K., Miller, J.F., Xu, Y., and Cheng, G. 2002. Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature.* 416:190-194.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Valerio, D.A., Guerrero, A.T., Nogueira, L.G., Vieira, S.M., Souza, D.G., Teixeira, M.M., Poole, S., Ferreira, S.H., and Cunha, F.Q. 2008. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur J Pain.* 12:1059-1068.
- Egan, P.J., van Nieuwenhuijze, A., Campbell, I.K., and Wicks, I.P. 2008. Promotion of the local differentiation of murine Th17 cells by synovial macrophages during acute inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 58:3720-3729.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Bertin, J., Sansonetti, P.J., and Philpott, D.J. 2003a. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 300:1584-1587.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. 2003b. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 278:8869-8872.
- Huber, L.C., Distler, O., Tarner, I., Gay, R.E., Gay, S., and Pap, T. 2006. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 45:669-675.

Inohara, Chamaillard, McDonald, C., and Nunez, G. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 74:355-383.

Inohara, N., del Peso, L., Koseki, T., Chen, S., and Nunez, G. 1998. RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 273:12296-12300.

Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y., and Nunez, G. 2000. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem.* 275:27823-27831.

Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F.F., Muto, A., and Nunez, G. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem.* 276:2551-2554.

Joosten, L.A., Heinhuis, B., Abdollahi-Roodsaz, S., Ferwerda, G., Lebourhis, L., Philpott, D.J., Nahori, M.A., Popa, C., Morre, S.A., van der Meer, J.W., Girardin, S.E., Netea, M.G., and van den Berg, W.B. 2008. Differential function of the NACHT-LRR (NLR) members Nod1 and Nod2 in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:9017-9022.

Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Nunez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature.* 416:194-199.

Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R.A. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 307:731-734.

Kolly, L., Karababa, M., Joosten, L.A., Narayan, S., Salvi, R., Petrilli, V., Tschopp, J., van den Berg, W.B., So, A.K., and Busso, N. 2009. Inflammatory role of ASC in antigen-induced arthritis is independent of caspase-1, NALP-3, and IPAF. *J Immunol.* 183:4003-4012.

Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., and Flavell, R.A. 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* 267:2000-2003.

Lemos, H.P., Grespan, R., Vieira, S.M., Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Fernandes, K.S., Souto, F.O., McInnes, I.B., Ferreira, S.H., Liew, F.Y., and Cunha, F.Q. 2009. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFNgamma production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:5954-5959.

Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., and et al. 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell.* 80:401-411.

Lubberts, E., Koenders, M.I., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C.J., Joosten, L.A., and van den Berg, W.B. 2004. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 50:650-659.

Maeda, S., Hsu, L.C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., and Karin, M. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science.* 307:734-738.

Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 10:417-426.

McCarthy, J.V., Ni, J., and Dixit, V.M. 1998. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem.* 273:16968-16975.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 276:4812-4818.

Ospelt, C., Brentano, F., Jungel, A., Rengel, Y., Kolling, C., Michel, B.A., Gay, R.E., and Gay, S. 2009. Expression, regulation, and signaling of the pattern-recognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain 2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 60:355-363.

Park, J.H., Kim, Y.G., McDonald, C., Kanneganti, T.D., Hasegawa, M., Body-Malapel, M., Inohara, N., and Nunez, G. 2007. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol.* 178:2380-2386.  
Pinto, L.G., Cunha, T.M., Vieira, S.M., Lemos, H.P., Verri-Jr, W.A., Cunha, F.Q., and Ferreira, S.H. 2009. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice *Pain.* in press.

Pohlers, D., Nissler, K., Frey, O., Simon, J., Petrow, P.K., Kinne, R.W., and Brauer, R. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol.* 135:409-415.

Rosenzweig, H.L., Jann, M.M., Glant, T.T., Martin, T.M., Planck, S.R., van Eden, W., van Kooten, P.J., Flavell, R.A., Kobayashi, K.S., Rosenbaum, J.T., and Davey, M.P. 2009. Activation of nucleotide oligomerization domain 2 exacerbates a murine model of proteoglycan-induced arthritis. *J Leukoc Biol.* 85:711-718.

Santos, L.L., Milenkovski, G.P., Hall, P.H., Leech, M., Sharma, L., Takeda, K., Akira, S., Kitching, A.R., and Morand, E.F. 2006. IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol Cell Biol.* 84:166-173.



Sidiropoulos, P.I., Goulielmos, G., Voloudakis, G.K., Petraki, E., and Boumpas, D.T. 2008. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. *Ann Rheum Dis.* 67:1382-1389.

Smolen, J.S., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M.H., and Emery, P. 2007. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 370:1861-1874.

Stetson, D.B., and Medzhitov, R. 2007. T helper 17 cells get the NOD. *Immunity.* 27:546-548.

Taktak, Y.S., and Lee, M. 1991. A solid phase enzyme immunoassay for serum amyloid A (SAA) protein. Clinical evaluation. *J Immunol Methods.* 136:11-16.

van Beelen, A.J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E.W., Muller, F.J., Hommes, D.W., Zaat, S.A., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity.* 27:660-669.

Vieira, S., Lemos, H., Grespan, R., Napimoga, M., Dal-Secco, D., Freitas, A., Cunha, T., Verri Jr, W., Souza-Junior, D., Jamur, M., Fernandes, K., Oliver, C., Silva, J., Teixeira, M., and Cunha, F. 2009. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br J Pharmacol.*

Zamboni, D.S., Kobayashi, K.S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E.M., Vance, R.E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Flavell, R.A., Dietrich, W.F., and Roy, C.R. 2006. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol.* 7:318-325.

## LEGENDS

**Figure 1. mRNA expression of NOD2 and NOD1 in blood or synovial cells from RA and OA patients.** mRNA expression of NOD1 (A) or NOD2 (B) in OA and RA mononuclear cells from peripheral blood or total cells from synovial fluid samples were calculated relative to the housekeeping gene GAPDH ( $2^{-\text{delta Ct value}} \times 1,000$ ). Three independent experiments were performed and results are expressed as means  $\pm$  SEM of 4 OA patients or 13 RA patients. \* $P < 0.05$  compared with OA samples.

**Figure 2. NOD2, but not NOD1, is involved in antigen-induced arthritis (A)** Synovial tissues were collected 3 h after i.a. injection of saline (control) or mBSA (10  $\mu\text{g}$ ; i.a.) in naïve or immunized mice. mRNA expression of NOD1 or NOD2 in synovial tissue samples were evaluated by real-time RT-PCR relative to the housekeeping gene  $\beta$ -actin ( $2^{-\text{delta Ct value}} \times 1,000$ ) expression. (B) WT,  $NOD1^{-/-}$  and  $NOD2^{-/-}$  immunized and sham-immunized mice were challenged with mBSA (10  $\mu\text{g}$ ; i.a.) or saline, and 24 h later neutrophil migration was determined in synovial fluid. (C) The nociceptive threshold was evaluated 7 h after i.a. injection of mBSA (30  $\mu\text{g}$ ; i.a.) or saline in WT,  $NOD1^{-/-}$  and  $NOD2^{-/-}$  immunized or sham-immunized mice. (D) Evaluation of proteoglycan loss induced by i.a. injection of mBSA (30  $\mu\text{g}$ ; i.a.) or saline in WT,  $NOD1^{-/-}$  and  $NOD2^{-/-}$  immunized or sham-immunized mice. Saline-challenged immunized mice were used as a control. (E) Histological analysis of articular cartilage in WT,  $NOD1^{-/-}$  and  $NOD2^{-/-}$  immunized mice after mBSA (30  $\mu\text{g}$ ; i.a.) challenge. Knee joints were stained with Safranin O-fast green. The concentrations of TNF- $\alpha$  (F) and KC (G) in the articular cavity were determined 3 and 12 h after challenge with mBSA (10  $\mu\text{g}$ ; i.a.) or saline in immunized mice or sham-immunized mice. Three independent experiments were performed and results are

expressed as means  $\pm$  SEM of 5 mice. \*  $P < 0.05$  versus sham-immunized mice #  $P < 0.05$  versus WT mice after mBSA challenge.

**Figure 3. The role of NOD2 in triggering the local IL-17 immune response.** The concentrations of IL-17 (A) and IL-1 $\beta$  (D) into the articular cavity of WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> or *NOD2*<sup>-/-</sup> mice were determined 3 and 12 h after challenge with mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) or saline in immunized mice or sham-immunized mice. mRNA expression of IL-6 (B) and IL-23 (C) in WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> or *NOD2*<sup>-/-</sup> synovial tissue samples was determined by real-time RT-PCR relative to  $\beta$ -actin ( $2^{-\Delta \text{Ct value}} \times 1,000$ ) expression. Synovial tissues were collected 3 h after i.a. injection of saline (control) or mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) in WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> or *NOD2*<sup>-/-</sup> immunized or sham-immunized mice. mRNA expression of IL-6 (E), IL-23 (F) or IL-1 $\beta$  (G) in OA and RA mononuclear cells from peripheral blood or total cells from synovial compartment samples were determined by real-time RT-PCR relative to GAPDH ( $2^{-\Delta \text{Ct value}} \times 1,000$ ) expression. Three independent experiments were performed and results are expressed as means  $\pm$  SEM of 5 mice per group, 4 OA patients or 13 RA patients. \* $P < 0.05$  versus control mice or OA sample cells. # $P < 0.05$  compared with WT immunized mice after mBSA challenge.

**Figure 4. RIPK2 is upregulated in rheumatoid arthritis and participates in antigen-induced arthritis.** (A) mRNA expression of RIPK2 in OA and RA mononuclear cells from peripheral blood or total cells from the synovial compartment was determined by real-time RT-PCR relative to GAPDH ( $2^{-\Delta \text{Ct value}} \times 1,000$ ) expression. (B) WT and *RIPK2*<sup>-/-</sup> immunized mice were challenged with mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) or saline, and 24 h later neutrophil migration was determined in synovial

fluid. (C) The nociceptive threshold was evaluated 7 h after i.a. injection of mBSA (30  $\mu$ g; i.a.) or saline in WT or *RIPK2*<sup>-/-</sup> immunized mice. (D) Evaluation of proteoglycan loss induced by i.a. injection of mBSA (30  $\mu$ g; i.a.) in WT and *RIPK2*<sup>-/-</sup> immunized mice. Saline-challenged immunized mice were used as a control. The concentrations of IL-17 (E), TNF- $\alpha$  (F), KC (G), and IL-1 $\beta$  (H) in the articular cavity were determined 12 h after challenge with mBSA or saline in immunized mice. Three independent experiments were performed and results are expressed as means  $\pm$  SEM of 5 mice per group, 4 OA patients or 13 RA patients. \**P* < 0.05 versus control mice or OA samples cells #*P* < 0.05 compared with WT immunized mice after mBSA challenge.

**Figure 5. Caspase-1 modulates the inflammatory response in joint inflammation.**

(A) WT or *Caspase-1*<sup>-/-</sup> (*Casp-1*<sup>-/-</sup>) immunized mice were challenged with mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) or saline, and 24 h later neutrophil migration was determined in synovial fluid. (B) The nociceptive threshold was evaluated 7 h after i.a. injection of mBSA (30  $\mu$ g; i.a.) or saline in WT or *Casp-1*<sup>-/-</sup> immunized mice (C) Evaluation of proteoglycan loss induced by i.a. injection of mBSA (30  $\mu$ g; i.a.) in WT and *Casp-1*<sup>-/-</sup> immunized mice. Saline-challenged immunized mice were used as a control. (D) Histological analysis of articular cartilage contents in WT and *Casp-1*<sup>-/-</sup> immunized mice after mBSA (30  $\mu$ g; i.a.) challenge. Knee joints were stained with Safranin O-fast green. The concentrations of IL-17 (E), and IL-1 $\beta$  (F) into the articular cavity were determined 12 h after challenge with mBSA (10  $\mu$ g; i.a.) or saline in immunized mice. Three independent experiments were performed and results are expressed as means  $\pm$  SEM of 5 mice per group. \**P* < 0.05 versus saline challenged mice. # *P* < 0.05 compared with WT immunized mice after mBSA challenge.

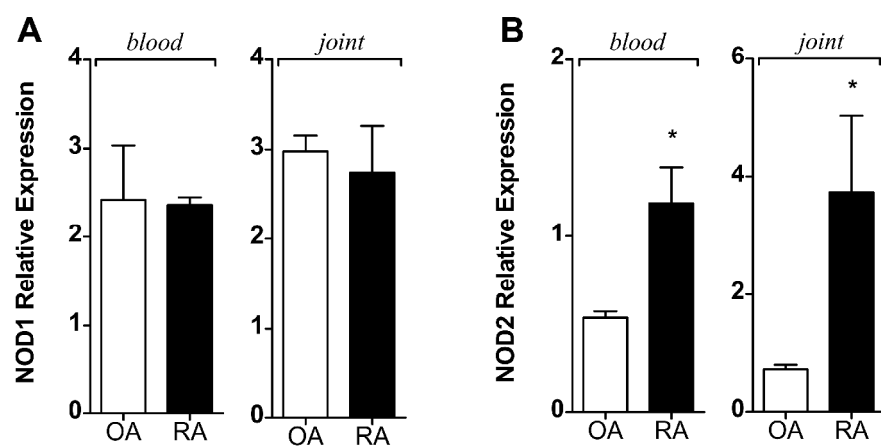
**Figure 6. NOD2/caspase-1 signaling is enhanced in RA patient-derived immune cells.** (A) Caspase-1 activation was determined in peripheral blood mononuclear cells from OA or RA patients after incubation with RPMI (control), NOD1 (FK156, 10  $\mu$ g/mL) and NOD2 (MDP, 100  $\mu$ g/mL) agonists. (A1-2) Representative FACS histograms of caspase-1 activation after FK156 or MDP incubation (B) Levels of IL-1 $\beta$  in the supernatant of peripheral blood mononuclear cells from OA or AR patients challenged with RPMI (control), FK156 (10  $\mu$ g/mL) or MDP (100  $\mu$ g/mL). Three independent experiments were performed and results are expressed as mean  $\pm$  SEM of mononuclear blood cells from 5 patients.

#### LEGENDS – Supplemental Data

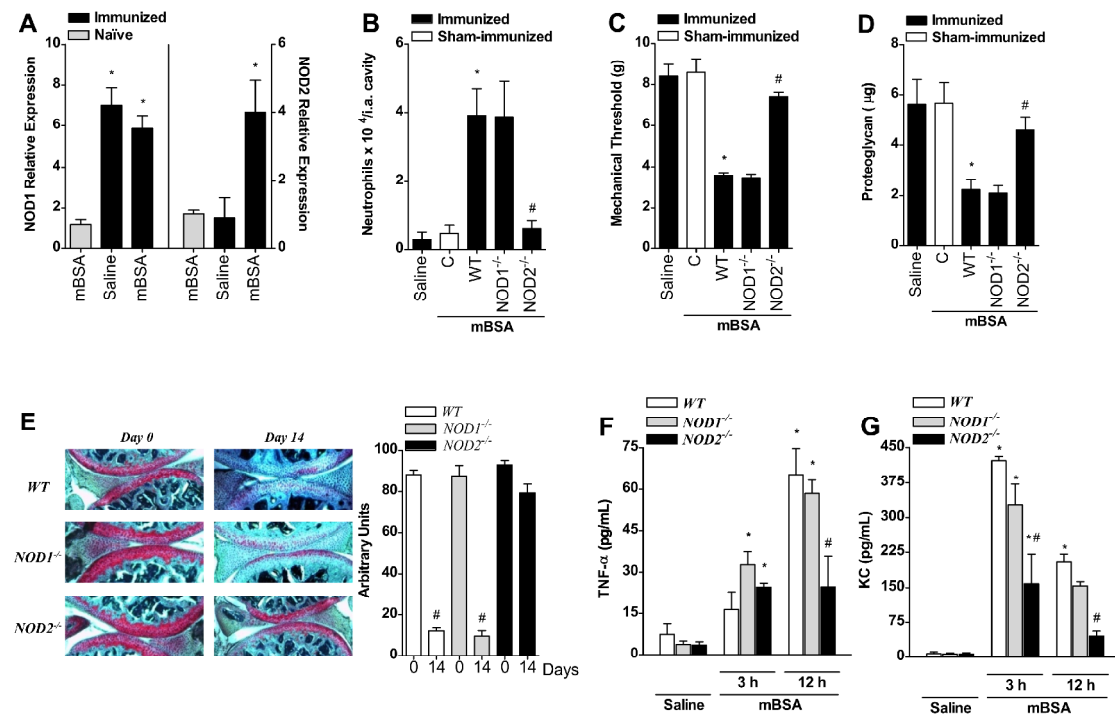
**Figure S1. Immunization state of WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> and *NOD2*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Lymph node-derived cells ( $5 \times 10^5$ /well) from WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> and *NOD2*<sup>-/-</sup> immunized mice were cultured in RPMI in the presence of ConA (0.5  $\mu$ g/mL) or mBSA (100  $\mu$ g/mL), and 96 h later, proliferation response was evaluated. (B) Levels of antibody against mBSA in the serum of WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> and *NOD2*<sup>-/-</sup> immunized and sham-immunized mice. (C) Lymph node-derived cells ( $5 \times 10^5$ /well) from WT, *NOD1*<sup>-/-</sup> and *NOD2*<sup>-/-</sup> immunized mice were cultured and stimulated with RPMI or mBSA (100  $\mu$ g/ml), and 72 h later the levels of IL-2 in the supernatant were determined by ELISA. Two independent experiments were performed and results are expressed as means  $\pm$  SEM of 5 mice or cultured cells from 5 animals. \**P* < 0.05 compared with medium stimulated cells or sham-immunized mice.

**Figure S2. IL-1ra treatment ameliorates antigen-induced arthritis. (A)** WT immunized mice were pretreated with vehicle or IL-1ra (10 mg/Kg, iv. 1 h before challenge) followed the i.a. injection of mBSA (10 µg; i.a.) or saline. 24 h later, neutrophil migration was determined. **(B)** The nociceptive threshold was evaluated 7 h after i.a. injection of mBSA (30 µg; i.a.) or saline in WT mice treated with IL-1ra (10 mg/Kg) or vehicle. **(C)** Evaluation of proteoglycan loss induced by i.a. injection of mBSA (30 µg; i.a.) in WT immunized mice pretreated with vehicle or IL-1ra (10 mg/Kg). Saline-challenged immunized mice were used as a control. Two independent experiments were performed and results are expressed as means ± SEM of 5 mice per group. \*  $P < 0.05$  compared with saline challenged mice; #  $P < 0.05$  compared with vehicle treated mice.

**Figure 1**

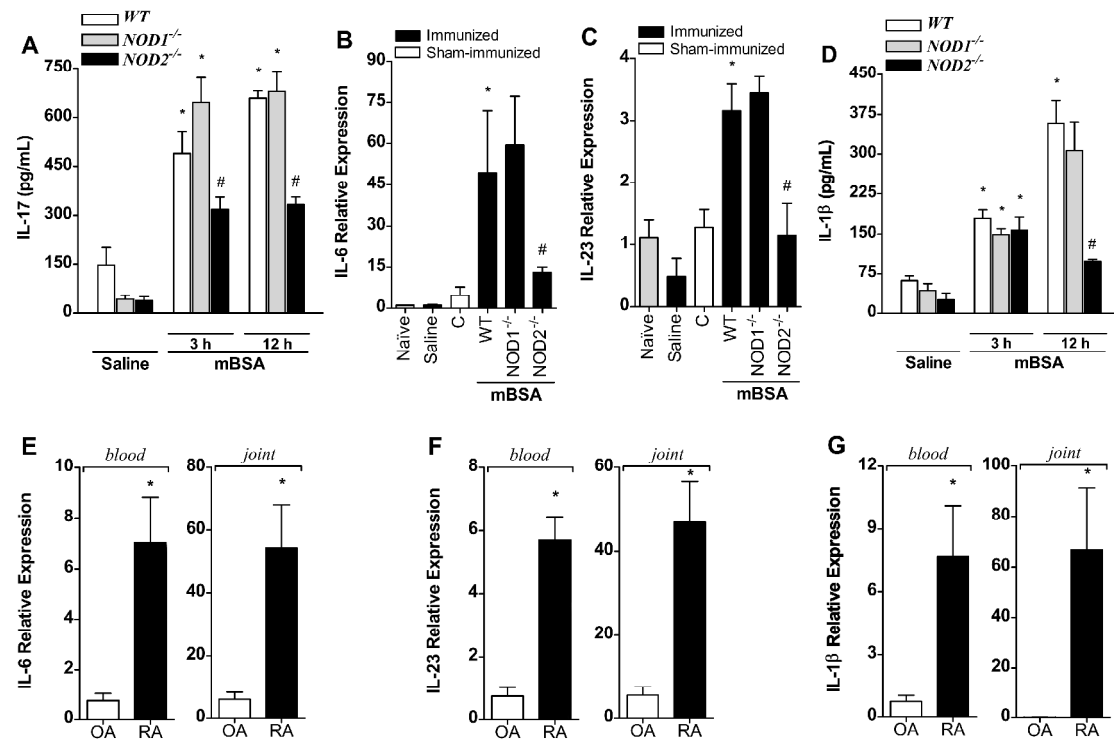


**Figure 2**

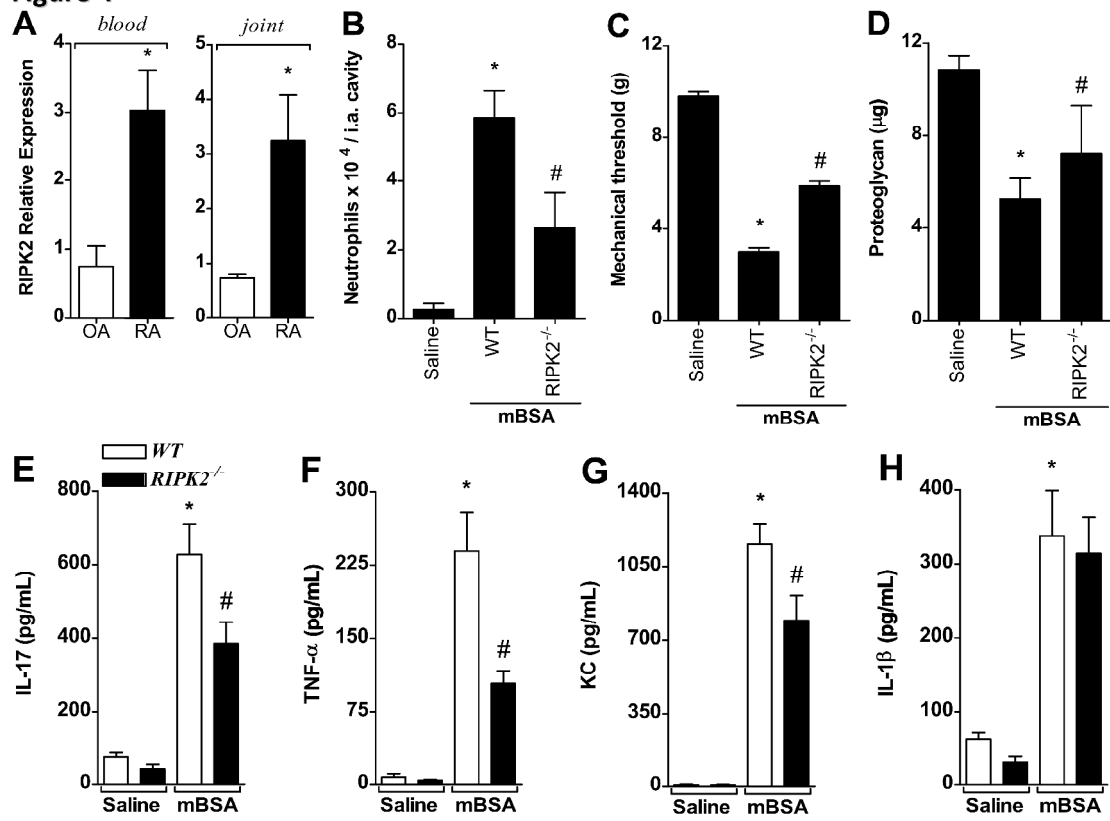




**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

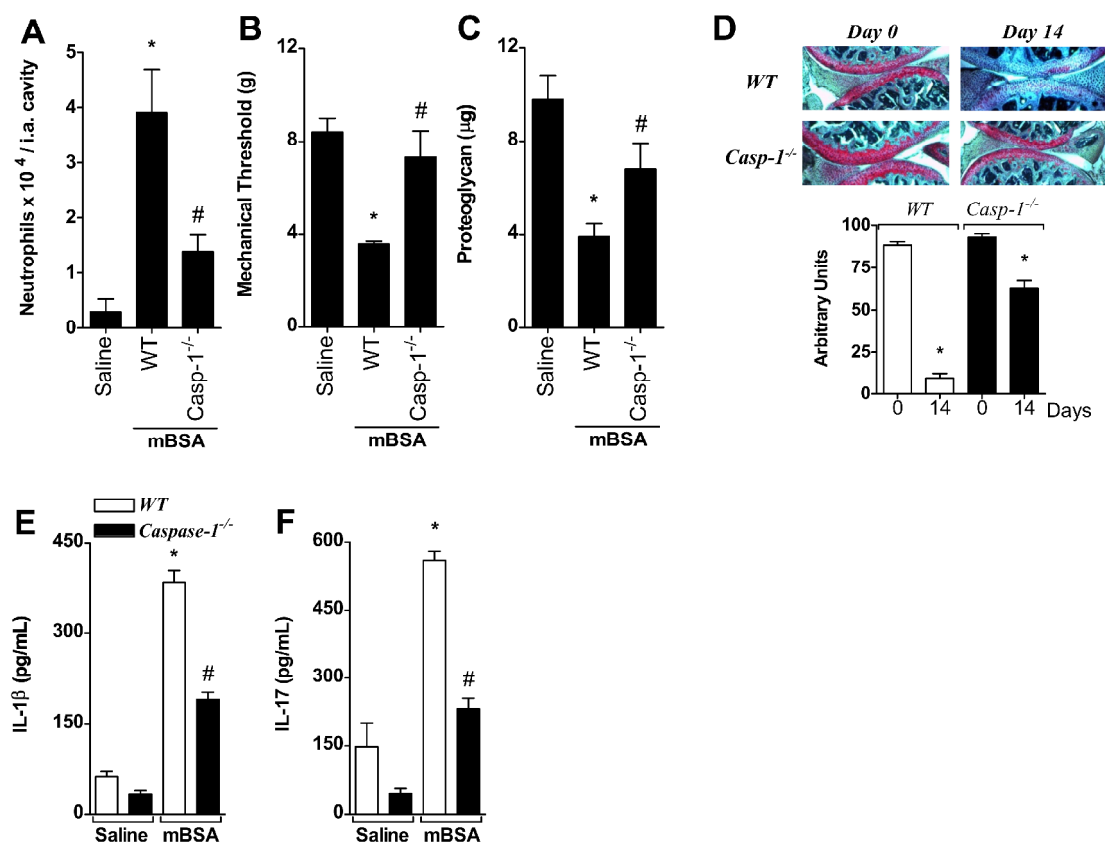
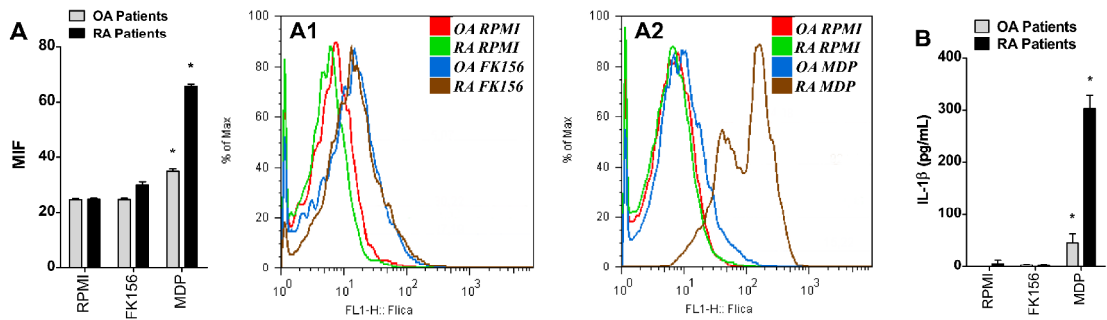


Figure 6



**Figure 1 – Supplemental data**

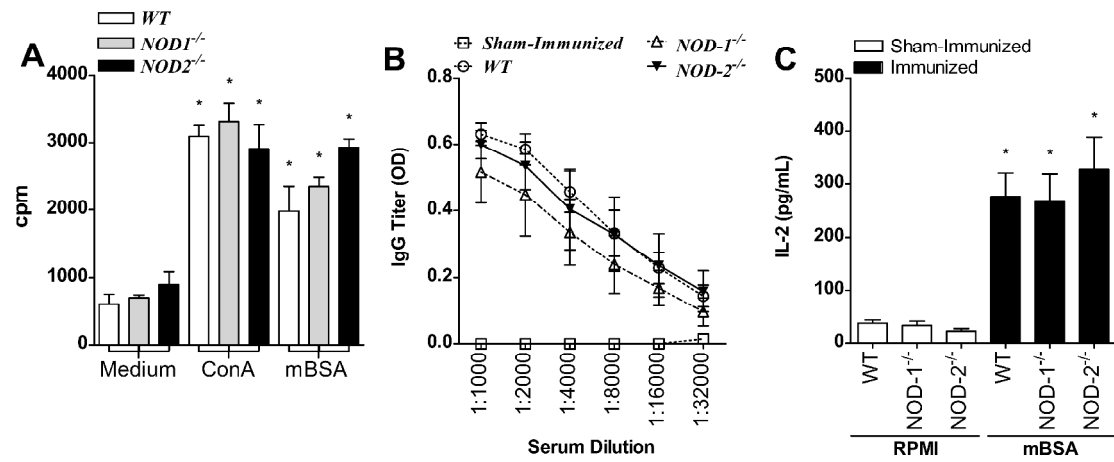
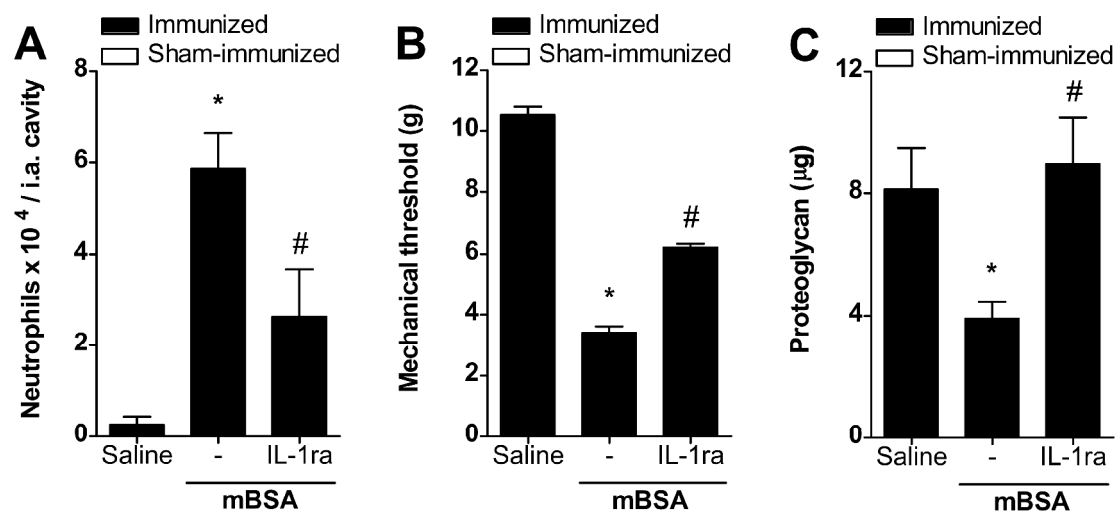


Figure 2 – Supplemental data



## Supplemental Table I

**Table I.** Clinical and demographic features of osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) patients treated with methotrexate alone or with methotrexate (MTX) plus infliximab.

| Clinical features                         | RA patients         |                              | OA patients<br>(n = 4) |
|-------------------------------------------|---------------------|------------------------------|------------------------|
|                                           | MTX only<br>(n = 4) | MTX +<br>anti-TNF<br>(n = 9) |                        |
| Mean age (years $\pm$ SEM)                | 51 $\pm$ 4.6        | 44.5 $\pm$ 4.9               | 53.9 $\pm$ 4.2         |
| Women (%)                                 | 4 (100 %)           | 7 (77 %)                     | 2 (50 %)               |
| Caucasian (%)                             | 4 (100 %)           | 9 (100 %)                    | 3 (75 %)               |
| RF-positive (%)                           | 3 (75 %)            | 6 (66 %)                     | 0 (0 %)                |
| Anti-CCP positive (%)                     | 2 (50 %)            | 6 (66 %)                     | 0 (0 %)                |
| Mean disease duration (years $\pm$ SEM)   | 3.5 $\pm$ 1.4       | 8.2 $\pm$ 2.38               | N/A                    |
| MTX dose (mg/week)                        | 16.9                | 17.2                         | None                   |
| MTX (months use – mean $\pm$ SEM)         | 13 $\pm$ 1.9        | 22.6 $\pm$ 1.3               | None                   |
| Infliximab dose (mg/kg/dose)              | None                | 4                            | None                   |
| Infliximab (months of use–mean $\pm$ SEM) | None                | 9.6 $\pm$ 0.8                | None                   |
| DAS-28 (mean $\pm$ SEM)                   | 5.1 $\pm$ 0.3       | 3.8 $\pm$ 0.5                | None                   |

RF = Rheumatoid Factor; Anti-CCP=anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; MTX = methotrexate; DAS = Disease Activity Score; N/A = Non-Applicable.

## Supplemental Table II

**Table II.** Primers used for Real-Time RT-PCR

| Human                           |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| GENE                            | FORWARD (5' – 3')               | REVERSE (5' – 3')               |
| <b>GAPDH</b>                    | ATC ACC ATC TTC CAG GAG         | ATG GAC TGT GGT CAT GAG         |
| <b>NOD1</b>                     | CAG CAC TTT CCC ATG TAT TGA T   | TCA AAT CCC ACA CTG CAC A       |
| <b>NOD2</b>                     | GGT TGA TGC CTG TGA ACT GAA     | AAA TGA AAT GGA ACT GCC TCT T   |
| <b>RIPK2</b>                    | ACA TGC CAA ATG GAT CAT TAA     | CAA TGG CCA AGC AAC ATC         |
| <b>IL-6</b>                     | GCC TTC GGT CCA GTT GCC TT      | GCA GAA TGA GAT GAG TTG TC      |
| <b>IL-23 p19</b>                | CTG ATA GCC CTG TGG GCC AG      | GCT GCC TTT AGG GAC TCA GG      |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>   | GCA ATG AGG ATG ACT TGT TCT TTG | CAG AGG TCC AGG TCC TGG AA      |
| Mouse                           |                                 |                                 |
| GENE                            | FORWARD (5' – 3')               | REVERSE (5' – 3')               |
| <b><math>\beta</math>-actin</b> | AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT      | AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT      |
| <b>NOD1</b>                     | GGA CAA CTT GCT GGA GAA T       | CTG CAG CAC GTA GAG GAA         |
| <b>NOD2</b>                     | CTT CAT TTG GCT CAT CCG TAG     | CTG GAG ATG TTG CAG TAC AAA G   |
| <b>IL-6</b>                     | AAC GAT GAT GCA CTT GCA GA      | GAG CAT TGG AAA TTG GGG TA      |
| <b>IL-23 p19</b>                | AAC AGA TGC CCA GCC TGA CTT CTA | AGG CCA ACC GCT CGA GAC TTT ATT |



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)