

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DO CCR5
EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE**

Charles Lubianca Kohem

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol
Co-orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies**

Tese de Doutorado

2005

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DO CCR5
EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE**

Charles Lubianca Kohem

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol
Co-orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies**

**Tese de Doutorado apresentada
junto ao Programa de Pós-
graduação em Medicina: Ciências
Médicas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
Médicas.**

2005

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACR20 *American College of Rheumatology* 20 (escore de 20% de melhora em um conjunto de critérios)
- ACR50 *American College of Rheumatology* 50 (escore de 50% de melhora em um conjunto de critérios)
- AR Artrite Reumatóide
- CCR1 *Chemokine Receptor* 1
- CCR5 *Chemokine Receptor* 5
- CD 27 Molécula de superfície expressa na maior parte dos linfócitos T e pequena parte de timócitos
- CD11a Cadeia α de moléculas de adesão da família de integrinas com cadeia $\alpha 2$
- CD4 Linfócito T auxiliar
- CD44 Glicoproteína de membrana que pode funcionar como molécula de adesão de linfócitos T a componentes da matriz extracelular
- CD45 Glicoproteína expressa na membrana de linfócitos T
- CD45 RA Isoforma do CD45 que expressa o Exon A
- CD45 RB Isoforma do CD45 que expressa o Exon B
- CD45 RO Isoforma do CD45 em que nenhum dos três Exons para a porção extracelular da glicoproteína é expresso
- CD69 Marcador de ativação de linfócitos T e B, macrófagos e células NK (*Natural Killer*)

CD8 Linfócito T citotóxico
d32 alelo variante CCR5 Δ 32
DAS <i>Disease Activity Score</i>
dNTP deoxinucleotídeos tri-fosfato
DRB1*04 (DR4) Alelo de molécula de histocompatibilidade de Classe II
FITC Fluoresceína isotiocianato
HAQ <i>Health Assessment Questionnaire</i>
HIV-1 <i>Human Immunodeficiency Virus-1</i>
HLA <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HLA-DRB1 Alelo DRB1 de molécula de histocompatibilidade de Classe II
ICAM-1 <i>Intercellular Adhesion Molecule -1</i>
IFN- γ Interferon- γ
IL-1 β Interleucina-1 β
IL-10 Interleucina-10
IL-4 Interleucina-4
kDa Kilodaltons
MHC <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-1 α <i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i>
MIP-1 β <i>Macrophage Inflammatory Protein-1β</i>
PCR Reação em cadeia da polimerase.
PE Ficoeritrina
RANTES <i>Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i>
TGF- β <i>Transforming Growth Factor-β</i>

Th1 Linfócito T *helper*-1
TNF- α Fator de Necrose Tumoral- α
WT *wild type* (gene original não-mutado).

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Análise celular por citometria de fluxo de amostras de sangue periférico comparadas com o líquido sinovial ou tecido sinovial em pacientes com artrite reumatóide.

FIGURA 1 - Expressão do CD4 e CD27 pelas células T do SP e LS em AR. Células T CD4⁺ foram isoladas nos retângulos R₂ (superior) e a expressão do CD27 foi analisada (inferior). Valores nos histogramas indicam a percentagem das células CD27⁺ (valores à direita) ou das células CD27⁻ (valores à esquerda) para amostras pareadas de 1 paciente representativo com AR. Os dados são representativos da coloração realizada em 9 pares de SP e LS ⁽¹³⁾.

FIGURA 2 - Expressão do CD27 por células T CD4⁺ normais (não-AR) e que expressam o CD45RO (superior), CD45RB (centro) e CD45RA (inferior), antes e após a migração transendotelial em um ensaio *in vitro*. As linhas verticais no painel central dividem as populações de células CD45RB^{bright} e CD45RB^{dim}, enquanto que os valores demonstrados representam a percentagem de células CD27⁺ e CD27⁻ para cada uma das duas subpopulações. Nos painéis superiores e nos inferiores os valores são percentagem de células em cada um dos quadrantes deste experimento representativo. Dados demonstrados são de 1 de 3 experimentos semelhantes ⁽¹³⁾.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	03
Lista de Tabelas e Figuras	05
Introdução	09
Revisão de literatura	15
Justificativa	25
Objetivos	26
Referências Bibliográficas	27
Tabelas e Figuras	38
Artigo em Inglês	42
Introduction	45
Patients and Methods	47
Statistical analysis	49
Results	50
Discussion	51
References	59
Artigo em português	64
Introdução	67
Pacientes e Métodos	69
Análise estatística	72
Resultados	72
Discussão	74

Referências Bibliográficas	82
----------------------------------	----

1. Introdução

1.1. Definição e epidemiologia

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica auto-imune com manifestações articulares e sistêmicas, de etiologia desconhecida [1, 2], cuja prevalência é estimada em 1% da população adulta mundial e brasileira [3, 4]. Caracteriza-se, basicamente, por sinovite crônica, simétrica e erosiva de articulações periféricas, e a maioria dos pacientes apresenta positividade no teste sorológico para o fator reumatóide. Embora a intensidade da atividade inflamatória da artropatia reumatóide possa flutuar com o tempo, o resultado final mais comum da doença estabelecida é o desenvolvimento progressivo de graus variados de destruição, deformidade e incapacidade articular. Além disto, pode existir uma variedade de manifestações extra-articulares, que vão desde febre e emagrecimento até o acometimento de órgãos internos como pulmões, coração, rins, entre outros.

1.2. Aspectos genéticos

Embora a AR seja notadamente uma doença de influência poligênica (tanto genes do MHC como também não-MHC), o polimorfismo hoje considerado central à suscetibilidade genética para o seu desenvolvimento é aquele dos alelos HLA de Classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), localizado no braço curto do cromossoma 6 [5-7]. As moléculas de Classe II associadas com a AR têm em comum genes HLA-DRB1 que codificam uma seqüência de aminoácidos dos códons 67-74 das moléculas DRB. Estas seqüências de aminoácidos LLEQRRAA ou LLEQKRAA comuns às variações alélicas do HLA-DRB1 são conhecidas como o “epítopo compartilhado”. Mais recentemente, tem-se constatado que os alelos DRB1*04 (DR4) que codificam o epítopo compartilhado, além de marcadores de suscetibilidade, são também responsáveis por uma maior severidade da doença[8]. Neste aspecto, parece haver um “efeito de dose”, onde indivíduos homocigotos apresentam doença mais grave do que heterocigotos para DRB1*04. A ativação do linfócito T (CD4+ no caso da AR) através de seu receptor se inicia pelo “encaixe” perfeito de um peptídeo na fenda de ligação antigênica de molécula HLA de Classe II presente na superfície da célula apresentadora de antígeno. Ocorre que a especificidade da interação antígeno-molécula HLA decorre exatamente do polimorfismo genético que determina quais os aminoácidos que irão formar a fenda de ligação antigênica da molécula HLA e sua estrutura tridimensional, permitindo ou não o acoplamento do antígeno. Assim, o epítopo compartilhado pelos alelos variantes da molécula HLA DRB1*04 descrito acima estaria presente na fenda de ligação antigênica da molécula HLA, conferindo suscetibilidade genética à AR a partir da ativação do linfócito T CD4+ via-receptor.

Existem dados sobre a correlação dos alelos HLA-DRB1 e o prognóstico da AR em pacientes brasileiros. Nestes estudos, se observou que os alelos HLA-DRB1*0101 e *0102 estiveram relacionados à suscetibilidade, enquanto os alelos HLA-DRB1*0401 e *0404 estiveram associados com doença mais agressiva [9].

1.3. Fisiopatogênese

Embora o estímulo etiológico da AR seja desconhecido, a atividade imunológica persistente, tanto sistemicamente quanto dentro do compartimento sinovial, é característica da patogênese da doença. A AR se distingue de outras doenças reumáticas pela intensidade da infiltração celular e acumulação de linfócitos T na membrana sinovial, geralmente em uma distribuição perivascular [2, 10].

Os linfócitos T que se acumulam nos compartimentos sinoviais na AR apresentam características imunofenotípicas de células de memória (CD45RA-/CD45RO+/CD11a^{bright}/CD44^{bright}) e ativadas (CD69+) [11-13] (**tabela 1**). Além disto, em um trabalho prévio nós demonstramos que estes linfócitos T são terminalmente diferenciados (CD4+/CD45RB^{dim}/CD27-) (**figura 1**), possuem uma capacidade aumentada para a migração transendotelial (**figura 2**) e se desenvolvem após estimulação antigênica prolongada [13]. O recrutamento continuado para a membrana sinovial, a partir do sangue periférico, destas células altamente ativadas, pode contribuir para a persistência da sinovite destrutiva [14],

mas os mecanismos que regulam esta migração celular ainda não são completamente entendidos.

1.3.1. Papel das quimiocinas

As quimiocinas são citocinas quimioatrativas liberadas por uma variedade de células. Suas funções biológicas incluem a quimiotaxia, adesão e penetração de leucócitos através de células endoteliais. Existem pelo menos 4 famílias de quimiocinas (CXC [ou α]CC [ou β], C e CX3C), com famílias específicas de receptores celulares para cada uma delas [15]. As quimiocinas têm um papel fundamental no processo inflamatório de doenças auto-imunes como a AR. Elas promovem a migração quimiotática de linfócitos e monócitos para os sítios de inflamação (compartimento sinovial), a partir de sua ligação com receptores específicos presentes na membrana destas células.

1.3.2. Influência do CCR5

O CCR5, um dos receptores da família de quimiocinas CC (composta por MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES), é expresso por monócitos/macrófagos e por linfócitos T com fenótipo Th1.

Aproximadamente 20 a 30% das células T periféricas e 10% dos monócitos são CCR5 positivos [16].

A descoberta de que o CCR5 serve como co-receptor celular do vírus HIV-1 foi um importante avanço no entendimento da patogênese da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) [17-20]. Numa sucessão de estudos epidemiológicos, identificou-se que a deleção de 32 pares de bases no gene do CCR5 (alelo CCR5 delta-32) abole a expressão do receptor em homozigotos, enquanto heterozigotos o expressam de forma menos intensa.

A freqüência genotípica desta deleção foi 1% de homozigotos e 20% de heterozigotos na população branca norte-americana [21-23]. Negros africanos e asiáticos não apresentaram o gene com deleção delta32 [24, 25]. O mais importante foi que indivíduos homozigotos para o alelo com deleção eram resistentes contra a infecção pelo HIV-1 [24-27]. Indivíduos heterozigotos parecem não estar protegidos contra o vírus; entretanto, apresentam uma menor carga viral e uma progressão de doença mais lenta [28]. Verificou-se, também, uma menor freqüência de heterozigotos nos soropositivos [25].

A partir disto, surge a hipótese de que pacientes com AR heterozigotos para o alelo CCR5 delta-32 teriam uma doença mais branda e homozigotos estariam protegidos da doença, isto é, **o polimorfismo genético do CCR5 poderia modular a severidade da AR [29, 30]**. De forma análoga, a importância do CCR5

no recrutamento de leucócitos para o sistema nervoso central de pacientes com esclerose múltipla é reforçada pelo melhor prognóstico dos pacientes homozigotos para a mutação CCR5 delta-32 [31, 32]. Estudos também mostraram a associação do CCR5 Δ 32 com um menor risco para o desenvolvimento de asma [33] e um melhor prognóstico de sobrevida renal pós-transplante em indivíduos homozigotos para esta mutação [34].

Os níveis das quimiocinas ligantes do CCR5 (MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES) estão aumentados no líquido e membrana sinovial de pacientes com AR quando comparados a controles (indivíduos com osteoartrose), e existe um gradiente destes mediadores do sangue periférico para o líquido sinovial na AR. Como a maior parte dos linfócitos T CD4⁺ presentes na membrana e líquido sinovial de pacientes com AR expressa o CCR5, há a possibilidade de que estas quimiocinas possam participar do recrutamento seletivo de células T para a sinóvia inflamada [35]. O mesmo pode ser dito em relação aos monócitos, já que vários estudos mostraram um aumento do percentual destas células expressando o CCR5 no compartimento sinovial [36-39]. Desta forma, **o bloqueio seletivo do CCR5 poderia ser um novo alvo para a intervenção terapêutica na AR** [40-44].

2. Revisão de literatura

2.1. Quimiocinas e seus receptores: estrutura e função

As quimiocinas são pequenos peptídeos quimioatrativos estruturalmente similares [45], assim como seus receptores cognatos [46]. Entretanto, a expressão específica, regulação e padrões de ligação a receptor de cada quimiocina cria uma diversidade funcional que permite às quimiocinas desempenhar papéis em processos tão distintos quanto a organogênese [47], hematopoiese [48], comunicação neuronal com a microglia [49], e o tráfego leucocitário e inflamação [50]. Estão associadas ao dano tecidual em doenças como aterosclerose, rejeição de transplantes e câncer [51]. Além disso, a desregulação das quimiocinas e seus receptores tem também sido implicada em várias condições auto-imunes [52].

Do ponto de vista estrutural, as quimiocinas são proteínas de 70-125 aminoácidos, com massas moleculares variando de 6 a 14 kDa [47]. A maioria é secretada, embora algumas, como a fractalquina, sejam expressas na superfície celular [53, 54]. Apesar da identidade de seqüência entre as quimiocinas ser muito baixa [45], a estrutura terciária global é marcadamente similar [55]. Na maior parte das situações, acredita-se que as quimiocinas atuem como monômeros [56].

A maioria delas contém pelo menos quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfídicas, uma entre a primeira e a terceira e outra entre a segunda e a quarta cisteína. A estrutura resultante contém três fitas com alças curtas. As quimiocinas são subdivididas em grupos C, CC, CXC ou CX3C dependendo do número de aminoácidos entre as primeiras duas cisteínas.

Há duas regiões em uma quimiocina que interagem com seu receptor. A primeira é uma alça exposta no esqueleto da molécula entre a segunda e a terceira cisteína, responsável pela ligação de baixa afinidade ao receptor. A

segunda é a porção amino-terminal antes da primeira cisteína, que representa a região de maior variabilidade. O sítio de ligação amino-terminal é necessário para sinalização intracelular via-receptor, e a quantidade e composição de aminoácidos desta porção da molécula é que determinam se a quimiocina se liga ao receptor com alta afinidade e se a ligação terá efeitos agonistas ou antagonistas [55].

Os receptores de quimiocinas são moléculas de 7 hélices acopladas à proteína G, tipicamente com tamanho de 340-370 aminoácidos. Há 25-80% de identidade entre eles e características comuns a todos: porção amino-terminal ácida, uma seqüência conservada de dez aminoácidos na segunda alça intracelular, e uma cisteína em cada um dos quatro domínios extracelulares ⁽⁴⁶⁾. Homodímeros pode ser a forma funcional de pelo menos alguns receptores de quimiocinas [57]. O sítio de ligação das quimiocinas é complexo, envolvendo vários sítios não-contíguos, incluindo o segmento amino-terminal [46].

Um efeito causado por todas as quimiocinas é a quimiotaxia da célula expressando o respectivo receptor em direção a áreas com concentrações mais altas de quimiocinas. A maioria delas é secretada, e para propiciar a quimiotaxia “in vivo”, estas proteínas devem ser imobilizadas na célula ou superfície de matriz extracelular através de interação com os glicosaminoglicanos carregados negativamente. De interesse, quimiocinas específicas se ligam a diferentes tipos de glicosaminoglicanos com afinidades divergentes [58]. O tipo de glicosaminoglicano pode variar com o tipo de célula, localização e estado inflamatório. Portanto, a imobilização seletiva em um dado sítio pode ser um passo regulatório que determina a função da quimiocina em certos tecidos ou estados inflamatórios.

As quimiocinas também podem agir induzindo mudanças na morfologia celular [59] ou ativando a aderência firme ao endotélio vascular dependente de integrinas das células rolantes, um importante passo no tráfego de leucócitos para sítios de inflamação [60]. A sinalização intracelular a partir da ligação ao receptor se dá pelo acoplamento de proteínas G, com posterior ativação de muitas vias intracelulares de fosforilação [61].

Em termos de seletividade das interações do par quimiocina-receptor, certas quimiocinas se ligam a somente um receptor e vice-versa, há receptores que se ligam exclusivamente a duas ou três quimiocinas, enquanto outros pares são mais promíscuos. Em geral, quimiocinas e receptores envolvidos em tráfego e ativação celular para sítios de inflamação tendem a participar de pareamento redundante e com sobreposições, enquanto os pares relacionados a direcionamento celular homeostático tendem a demonstrar interações mais exclusivas.

As quimiocinas envolvidas no tráfego homeostático são expressas constitutivamente por muitos tipos celulares, enquanto a expressão de quimiocinas pró-inflamatórias, em contraste, é induzida somente sob condições específicas, tipicamente por citocinas pró-inflamatórias. O lipopolissacarídeo, IL-1 β e o TNF- α induzem ampla expressão de quimiocinas inflamatórias por uma variedade de tipos celulares; o IFN- δ induz a expressão de quimiocinas que recrutam monócitos, neutrófilos e linfócitos Th1 e seu efeito é antagonizado pela IL-4 [62].

A expressão dos receptores de quimiocinas também é regulada por uma variedade de estímulos inflamatórios [62]. O CCR5, expresso por linfócitos, monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos, tem sua expressão induzida por citocinas Th1, mas pode ser suprimido pela IL-10 e TGF- β [63].

2.2. CCR5 e artrite reumatóide

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória sistêmica onde ocorre um predomínio nítido do fenótipo Th1 de resposta celular [64, 65]. Desta forma, quimiocinas pró-inflamatórias (RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β) promovem a quimiotaxia de monócitos e linfócitos T CD4 para o interior das articulações, a partir de sua ligação ao CCR5 expresso na membrana destas células.

Esta participação do CCR5 no recrutamento seletivo de linfomonócitos do sangue periférico para a membrana sinovial reumatóide poderia explicar, conforme mencionado anteriormente, porque os pacientes heterozigotos para o alelo delta-32 apresentam doença mais branda e os homozigotos ficam menos suscetíveis à AR.

2.2.1. Polimorfismo do CCR5 modula a doença: estudos prévios

Com o objetivo de estudar a influência do polimorfismo genético do CCR5 na expressão clínica da AR, Garred et al [66] procederam a análise genotípica de 163 pacientes com AR. Nesta população, os autores encontraram 131 pacientes *wild type* (WT), 30 heterozigotos para o alelo delta-32 e 2 pacientes homozigotos. Embora estas freqüências, segundo os autores, não se desviem do previsto em populações controle, o polimorfismo parece ter influência em variáveis clínicas da doença: o fator reumatóide foi negativo em 9% de WT versus 29% dos heterozigotos para o delta-32 ($p=0.007$); a proporção de pacientes com edema articular foi significativamente menor nos heterozigotos (WT 58% X hetero 35%, com $p=0.03$), assim como o tempo de rigidez matinal (WT 60 min X hetero 0 min, com $p=0.002$). Os autores concluem que o alelo delta-32 do CCR5 parece ter influência sobre algumas variáveis clínicas da doença, sugerindo que a inibição de receptores de quimiocinas possa ser um alvo potencial para a terapia modificadora da artrite reumatóide.

Em outro estudo que objetivou investigar se a patogênese da AR se associa com o CCR5, Gómez-Reino et al [67] procederam a análise genotípica de 673 pacientes com AR, 113 com lúpus eritematoso sistêmico e 815 controles. Os autores não encontraram diferença entre os grupos para WT e heterozigotos para o CCR5 delta-32. Nenhum dos pacientes com AR foi homozigoto para o delta-32, comparados a uma freqüência de 0.009 em controles ($p=0.014$) e de 0.027 no lúpus ($p=0.003$). Mais uma vez, os resultados sugerem que o receptor CCR5 tenha um papel importante na AR e possa vir a ser alvo da terapia da doença.

Wedderburn et al [43] realizaram a análise imunofenotípica comparativa do sangue periférico e líquido sinovial de 20 pacientes com artrite idiopática juvenil,

além da genotipagem destes pacientes. Os autores encontraram um predomínio de linfócitos T CCR5+ no líquido sinovial em comparação com o sangue periférico. Um achado interessante foi o de um paciente com artrite idiopática juvenil ser homozigoto para o alelo delta-32. Estes achados sugerem que o fenótipo Th1 altamente ativado das células T dentro das articulações cronicamente inflamadas de crianças com artrite idiopática juvenil possa refletir eventos de recrutamento específicos que contribuem para a polarização destas células.

Zapico et al [29] também sugeriram a hipótese de que o polimorfismo do CCR5 pudesse modular a severidade da AR. Os autores realizaram a análise genotípica de 160 pacientes caucasianos com AR (71 com doença severa e 89 com não-severa) e 500 controles. Os pacientes portadores do alelo delta-32 foram encontrados em uma frequência significativamente maior ($p=0.012$) em doença não-severa comparativamente à severa (17% X 4%). Estes resultados sugerem que o polimorfismo do CCR5 delta-32 seja um marcador genético relacionado à severidade da AR.

Pokorny et al [68] realizaram a análise genotípica de 563 pacientes com AR e 1002 controles, e acompanharam clinicamente por dois anos uma sub-coorte de 112 dos pacientes com doença de início há menos de seis meses. Os autores encontraram 12 controles (1,2%) e nenhum paciente com AR homozigoto para o alelo delta-32 do CCR5. Houve também diferença significativa na comparação dos heterozigotos ($p=0,0017$): 17% dos controles e 10% dos pacientes com AR. Comparados aos pacientes com AR com dois alelos WT, após dois anos de seguimento, os pacientes WT/d32 com doença de início recente avaliados prospectivamente tinham uma velocidade de sedimentação globular mediana

menor (WT/WT 22 e WT/d32 13 mm em 1 hora, $p=0,007$), e uma tendência à proteína C reativa mediana menor. Não houve diferença nos escores funcionais HAQ ou DAS. No entanto, os pacientes WT/WT tiveram maior probabilidade de ter doença erosiva do que os WT/d32 (81% e 19% respectivamente, $p=0,043$). Este estudo confirma o efeito protetor do alelo variante delta-32 do CCR5 em uma amostra grande de pacientes com AR.

John et al [69] realizaram um estudo genético em 438 pacientes com poliartrite de início recente identificados em uma base populacional, os quais foram acompanhados por cinco anos. Deste total de pacientes, 75% preenchiam os critérios do Colégio Americano de Reumatologia para AR. A genotipagem foi realizada em 430 pacientes e o alelo delta-32 foi encontrado em 10%, o que estava dentro do esperado. Surpreendentemente e em oposição aos estudos anteriores, a mutação delta-32 não esteve associada à menor severidade de doença ou atividade inflamatória nos pacientes com poliartrite, após cinco anos de seguimento.

2.3. Mecanismos de migração celular: alvo terapêutico na AR

O entendimento dos mecanismos que regulam a migração transendotelial das células de resposta inflamatória na AR, desde sua saída do sangue periférico até a chegada ao compartimento sinovial, permitiu tentativas de bloqueio de interações celulares via-receptor como alvos terapêuticos. Assim, a chamada terapia biológica da AR teve entre seus primeiros passos a utilização de

anticorpos monoclonais que bloqueavam moléculas de adesão de leucócitos. Após o sucesso da utilização do anticorpo monoclonal Anti-CD18 (β 2-integrina) em modelo animal de artrite induzida por antígeno [70], estudos de fase I/II utilizando o anticorpo monoclonal murino anti-ICAM-1 em pacientes com AR tiveram resultados encorajadores [71-73].

A produção de quimiocinas na articulação reumatóide pode ser bloqueada diretamente ou, indiretamente, pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF}\alpha$ e IL-1. Assim, o Infliximab, um anticorpo monoclonal anti- $\text{TNF}\alpha$ reduziu a expressão sinovial de IL-8 e MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) em pacientes com AR, acompanhado por um ingresso diminuído de células inflamatórias para a sinóvia [74].

Já em um modelo animal de AR, a imunização passiva com anti-MIP-1 α retardou o início e reduziu a severidade da artrite induzida por colágeno em camundongos [75]. Em outro estudo semelhante, porém utilizando o modelo de artrite adjuvante em rato, a utilização de um anticorpo policlonal direcionado ao RANTES humano resultou em melhora clínica, redução da infiltração celular e dano articular; no entanto, o tratamento direcionado ao MIP-1 α , no mesmo modelo, não influenciou a doença [76]. A utilização deste mesmo modelo de artrite induzida por adjuvante em rato, porém com a estratégia de bloqueio à ação do RANTES e MIP-1 α e β através do bloqueio com Met-RANTES, mostrou redução da inflamação articular, destruição óssea e recrutamento celular para as articulações [77]. Yang et al [78], utilizando um antagonista não-peptídico do CCR5, observaram uma redução tanto da incidência quanto da severidade da

artrite induzida por colágeno em camundongos, a partir da modulação da migração de linfócitos T. Mais recentemente, Vierboom et al [79] demonstraram a inibição do desenvolvimento de artrite induzida por colágeno em um modelo em primatas não-humanos (macacos *rhesus*), utilizando um antagonista do CCR5 de baixo peso molecular. Além destes, há uma série de outros estudos *in vitro* ou em modelos animais de AR onde se demonstra o efeito favorável do bloqueio direto de quimiocinas através de anticorpos monoclonais [80].

A partir do conhecimento de que a maioria das células linfomononucleares presentes no compartimento sinovial expressam o CCR5, Brühl et al [81] apontaram uma possível nova estratégia de tratamento biológico para a AR. Os autores criaram dois modelos de moléculas capazes de destruir seletivamente células que expressam o CCR5: o primeiro, um anticorpo bi-específico que se liga simultaneamente ao CCR5 e ao CD3; o segundo, uma proteína de fusão da quimiocina RANTES a uma versão truncada da exotoxina A de *Pseudomonas*. Utilizando o anticorpo bi-específico, 95% dos monócitos e linfócitos CCR5+ obtidos do líquido sinovial de pacientes com AR foram eliminados *ex vivo*.

Um trabalho recente sugeriu o potencial de tratamento com um antagonista do CCR1 (outro receptor de quimiocina) em pacientes com AR [82]. Em um estudo relativamente pequeno de fase Ib, pacientes foram tratados com um antagonista potente e seletivo do CCR1 por 2 semanas, o qual foi bem tolerado. As análises de amostras de tecido sinovial mostraram uma clara redução na inflamação sinovial no grupo tratado ativamente quando comparado ao grupo placebo. Embora o estudo não tenha sido desenhado para determinar eficácia clínica, um terço dos pacientes do grupo ativo atingiu critérios de melhora ACR20

(incluindo um paciente com ACR50) já após duas semanas de tratamento, enquanto não houve respondedores no grupo placebo. Este é o primeiro estudo em humanos mostrando que o antagonismo de quimiocinas poderia ser exeqüível e sugerindo que é possível influenciar a migração de células inflamatórias em uma doença inflamatória crônica utilizando-se um antagonista específico de receptor de quimiocina disponível para uso por via oral.

3. Justificativa

A artrite reumatóide é uma doença crônica incapacitante e que pode gerar mortalidade prematura, com altos custos individuais e de saúde pública. Apesar dos enormes avanços no entendimento de sua fisiopatogenia, com marcada repercussão no surgimento de novas terapias mais efetivas para o seu controle, ainda hoje o tratamento desta doença está longe do ideal.

Dentro deste contexto de avanço no conhecimento dos mecanismos que levam ao surgimento e perpetuação da AR, o papel das quimiocinas e seus receptores parece ser fundamental. Assim, o CCR5 desponta como um receptor de quimiocinas com importância central para o acúmulo de linfócitos e células mononucleares no ambiente sinovial de pacientes com AR. O polimorfismo genético do CCR5, e a conseqüente expressão variável deste marcador na superfície de linfócitos e monócitos, parece ter a capacidade de modular a gravidade da doença. Daí advém uma nova possibilidade de alvo terapêutico na AR, utilizando-se moléculas que possam bloquear a interação entre quimiocinas e

seus receptores, particularmente o CCR5. Os estudos sobre o polimorfismo do CCR5 em AR ainda são inéditos no nosso meio.

4. Objetivos

4.1 Identificar a frequência do polimorfismo genético do receptor de quimiocinas CCR5 em indivíduos com AR.

4.2 Comparar o polimorfismo genético do receptor de quimiocinas CCR5 de indivíduos com AR com o de voluntários sadios.

4.3 Comparar a expressão fenotípica do CCR5 de linfócitos T e monócitos do sangue periférico com a do líquido sinovial em uma mesma subpopulação de pacientes com AR.

Referências bibliográficas

1. Utzinger PD, Z.N., Ehrlich GE, *Rheumatoid arthritis, Etiology, Diagnosis and Treatment*. 1985: JB Lippincott Co. 934.
2. Harris, E.D., Jr., *Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy*. N Engl J Med, 1990. 322(18): p. 1277-89.
3. Wolfe, A.M., *The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys*. Bull Rheum Dis, 1968. 19(2): p. 518-23.
4. Marques Neto, J.F., Gonsalves, H.T. et al., *Estudo multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatóide do adulto em amostras da população brasileira*. Revista Brasileira de Reumatologia, 1993. 33: p. 169-73.
5. Wordsworth, B.P., et al., *HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(24): p. 10049-53.
6. Nepom, G.T., et al., *HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes*. Arthritis Rheum, 1989. 32(1): p. 15-21.
7. Ronningen, K.S., et al., *Rheumatoid arthritis may be primarily associated with HLA-DR4 molecules sharing a particular sequence at residues 67-74*. Tissue Antigens, 1990. 36(5): p. 235-40.
8. Weyand, C.M., et al., *The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis*. Ann Intern Med, 1992. 117(10): p. 801-6.

9. Bértolo MB, C.L., Persoli LB, Costa FF, *HLA-DRB1 alleles and the prognosis of rheumatoid arthritis in brazilian patients*. Revista Brasileira de Reumatologia, 2001. 41: p. 151-6.
10. Cush, J.J. and P.E. Lipsky, *Cellular basis for rheumatoid inflammation*. Clin Orthop Relat Res, 1991(265): p. 9-22.
11. Thomas, R., et al., *Rheumatoid synovium is enriched in CD45RBdim mature memory T cells that are potent helpers for B cell differentiation*. Arthritis Rheum, 1992. 35(12): p. 1455-65.
12. Cush, J.J. and P.E. Lipsky, *Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. 31(10): p. 1230-8.
13. Kohem, C.L., et al., *Enrichment of differentiated CD45RBdim,CD27-memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1996. 39(5): p. 844-54.
14. Murray, K., S.D. Thompson, and D.N. Glass, *Pathogenesis of juvenile chronic arthritis: genetic and environmental factors*. Arch Dis Child, 1997. 77(6): p. 530-4.
15. Ward, S.G., K. Bacon, and J. Westwick, *Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction*. Immunity, 1998. 9(1): p. 1-11.
16. Segerer, S., et al., *Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases*. Kidney Int, 1999. 56(1): p. 52-64.
17. Alkhatib, G., et al., *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1*. Science, 1996. 272(5270): p. 1955-8.

18. Doranz, B.J., et al., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors.* Cell, 1996. 85(7): p. 1149-58.
19. Choe, H., et al., *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.* Cell, 1996. 85(7): p. 1135-48.
20. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.* Nature, 1996. 381(6584): p. 661-6.
21. Martinson, J.J., et al., *Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion.* Nat Genet, 1997. 16(1): p. 100-3.
22. Libert, F., et al., *The deltaccr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe.* Hum Mol Genet, 1998. 7(3): p. 399-406.
23. Stephens, J.C., et al., *Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes.* Am J Hum Genet, 1998. 62(6): p. 1507-15.
24. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.* Cell, 1996. 86(3): p. 367-77.
25. Samson, M., et al., *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.* Nature, 1996. 382(6593): p. 722-5.
26. Zimmerman, P.A., et al., *Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations*

with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. Mol Med, 1997. 3(1): p. 23-36.

27. Dean, M., et al., *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Science, 1996. 273(5283): p. 1856-62.*
28. Huang, Y., et al., *The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. Nat Med, 1996. 2(11): p. 1240-3.*
29. Zapico, I., et al., *CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. Genes Immun, 2000. 1(4): p. 288-9.*
30. Patel, D.D., J.P. Zachariah, and L.P. Whichard, *CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. Clin Immunol, 2001. 98(1): p. 39-45.*
31. Huang, D., et al., *Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. Immunol Rev, 2000. 177: p. 52-67.*
32. Sellebjerg, F., et al., *CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. J Neuroimmunol, 2000. 102(1): p. 98-106.*
33. Hall, I.P., et al., *Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. Lancet, 1999. 354(9186): p. 1264-5.*
34. Fischereder, M., et al., *CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. Lancet, 2001. 357(9270): p. 1758-61.*

35. Suzuki, N., et al., *Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis*. *Int Immunol*, 1999. 11(4): p. 553-9.
36. Nissinen, R., et al., *CCR3, CCR5, interleukin 4, and interferon-gamma expression on synovial and peripheral T cells and monocytes in patients with rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2003. 30(9): p. 1928-34.
37. Kawanaka, N., et al., *CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(10): p. 2578-86.
38. Katschke, K.J., Jr., et al., *Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(5): p. 1022-32.
39. Mack, M., et al., *Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1999. 42(5): p. 981-8.
40. Nanki, T. and P.E. Lipsky, *Lack of correlation between chemokine receptor and T(h)1/T(h)2 cytokine expression by individual memory T cells*. *Int Immunol*, 2000. 12(12): p. 1659-67.
41. Shieh, B., et al., *Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4*. *Int Immunol*, 2000. 12(9): p. 1311-8.
42. Aarvak, T., et al., *Changes in the Th1 or Th2 cytokine dominance in the synovium of rheumatoid arthritis (RA): a kinetic study of the Th subsets in one unusual RA patient*. *Rheumatology (Oxford)*, 2000. 39(5): p. 513-22.

43. Wedderburn, L.R., et al., *Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(4): p. 765-74.
44. Venables, P.J. and A. Hajeer, *Delta32CCR5 and rheumatoid arthritis: comment on the article by Gomez-Reino et al*. *Arthritis Rheum*, 1999. 42(12): p. 2732-3.
45. Wells, T.N. and A.E. Proudfoot, *Chemokine receptors and their antagonists in allergic lung disease*. *Inflamm Res*, 1999. 48(7): p. 353-62.
46. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. *Pharmacol Rev*, 2000. 52(1): p. 145-76.
47. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(16): p. 9448-53.
48. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function*. *J Leukoc Biol*, 1999. 65(1): p. 6-15.
49. Harrison, J.K., et al., *Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(18): p. 10896-901.
50. Cyster, J.G., *Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs*. *Science*, 1999. 286(5447): p. 2098-102.
51. Christopherson, K., 2nd and R. Hromas, *Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses*. *Stem Cells*, 2001. 19(5): p. 388-96.

52. Arimilli, S., et al., *Chemokines in autoimmune diseases*. Immunol Rev, 2000. 177: p. 43-51.
53. Imai, T., et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. Cell, 1997. 91(4): p. 521-30.
54. Sawai, H., et al., *T cell costimulation by fractalkine-expressing synoviocytes in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2005. 52(5): p. 1392-401.
55. Clark-Lewis, I., et al., *Structure-activity relationships of chemokines*. J Leukoc Biol, 1995. 57(5): p. 703-11.
56. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 675-705.
57. Rodriguez-Frade, J.M., et al., *The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(7): p. 3628-33.
58. Kuschert, G.S., et al., *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. Biochemistry, 1999. 38(39): p. 12959-68.
59. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. 392(6676): p. 565-8.
60. Ley, K., *Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants*. Immunol Res, 2001. 24(1): p. 87-95.
61. Bokoch, G.M., *Chemoattractant signaling and leukocyte activation*. Blood, 1995. 86(5): p. 1649-60.

62. Syrbe, U., J. Siveke, and A. Hamann, *Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression?* Springer Semin Immunopathol, 1999. 21(3): p. 263-85.
63. Patterson, B.K., et al., *Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes.* Clin Immunol, 1999. 91(3): p. 254-62.
64. Dolhain, R.J., et al., *Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 1996. 39(12): p. 1961-9.
65. Ronnelid, J., et al., *Production of T-cell cytokines at the single-cell level in patients with inflammatory arthritides: enhanced activity in synovial fluid compared to blood.* Br J Rheumatol, 1998. 37(1): p. 7-14.
66. Garred, P., et al., *CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 1998. 25(8): p. 1462-5.
67. Gomez-Reino, J.J., et al., *Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5.* Arthritis Rheum, 1999. 42(5): p. 989-92.
68. Pokorny, V., et al., *Evidence for negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2005. 64(3): p. 487-90.
69. John, S., et al., *Genetic variation in CCR5 does not predict clinical outcome in inflammatory arthritis.* Arthritis Rheum, 2003. 48(12): p. 3615-6.

70. Jasin, H.E., et al., *Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbits treated with monoclonal antibodies to leukocyte adhesion molecules*. *Arthritis Rheum*, 1992. 35(5): p. 541-9.
71. Kavanaugh, A.F., et al., *Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1*. *Arthritis Rheum*, 1994. 37(7): p. 992-9.
72. Kavanaugh, A.F., et al., *Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody*. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(5): p. 849-53.
73. Kavanaugh, A.F., et al., *A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54) monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 1996. 23(8): p. 1338-44.
74. Taylor, P.C., et al., *Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(1): p. 38-47.
75. Kasama, T., et al., *Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis*. *J Clin Invest*, 1995. 95(6): p. 2868-76.
76. Barnes, D.A., et al., *Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model*. *J Clin Invest*, 1998. 101(12): p. 2910-9.
77. Shahrara, S., et al., *Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES*. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(6): p. 1907-1919.

78. Yang, Y.F., et al., *A non-peptide CCR5 antagonist inhibits collagen-induced arthritis by modulating T cell migration without affecting anti-collagen T cell responses*. Eur J Immunol, 2002. 32(8): p. 2124-32.
79. Vierboom, M.P., et al., *Inhibition of the development of collagen-induced arthritis in rhesus monkeys by a small molecular weight antagonist of CCR5*. Arthritis Rheum, 2005. 52(2): p. 627-36.
80. Szekanecz, Z., J. Kim, and A.E. Koch, *Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis*. Semin Immunol, 2003. 15(1): p. 15-21.
81. Bruhl, H., et al., *Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV*. J Immunol, 2001. 166(4): p. 2420-6.
82. Haringman, J.J., et al., *Chemokine blockade and chronic inflammatory disease: proof of concept in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. 62(8): p. 715-21.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 -Análise celular por citometria de fluxo de amostras de sangue periférico (SP) comparadas com líquido sinovial (LS) ou tecido sinovial (TS) em pacientes com artrite reumatóide ⁽¹³⁾ * #.

Antígeno de Superfície	SP vs. LS†		SP vs. TS†	
	Linfócitos	Linfócitos	Linfócitos	Linfócitos
	SP	LS	SP	TS
CD45RO	39,7 ± 3,6	80,3 ± 2,3‡	40,2 ± 4,3	70,3 ± 3,5‡
CD45RA	43,8 ± 3,3	13,3 ± 1,6‡	43,7 ± 4,6	16,8 ± 1,1‡
CD45RA+/CD45RO+	13,5 ± 0,9	4,8 ± 0,7‡	14,2 ± 1,9	5,2 ± 1,2‡
CD4	45,7 ± 2,7	44,5 ± 3,3	42,5 ± 5,3	51,5 ± 7,6
CD8	27,3 ± 2,5	46,5 ± 5,3‡	27,7 ± 2,4	28,2 ± 4,1
CD62L	58,0 ± 4,4	28,6 ± 4,1‡	59,0 ± 6,9	19,8 ± 6,7‡
CD54	35,0 ± 3,2	67,0 ± 7,8‡	37,3 ± 11,4	46,3 ± 13,4‡
CD69	13,4 ± 3,9	72,6 ± 3,5‡	15,3 ± 4,4	85,9 ± 3,7‡

* Dados em média ± DP do percentual de células em cada população que expressa o determinante específico

† n = 8-10 para SP vs. LS; n = 6 para SP vs. TS.

‡ Estatisticamente diferente para linfócitos do SP ($p \leq 0,05$).

- O trabalho citado foi desenvolvido pelo autor desta tese durante *fellowship* realizado no Serviço de Reumatologia da Universidade do Texas.

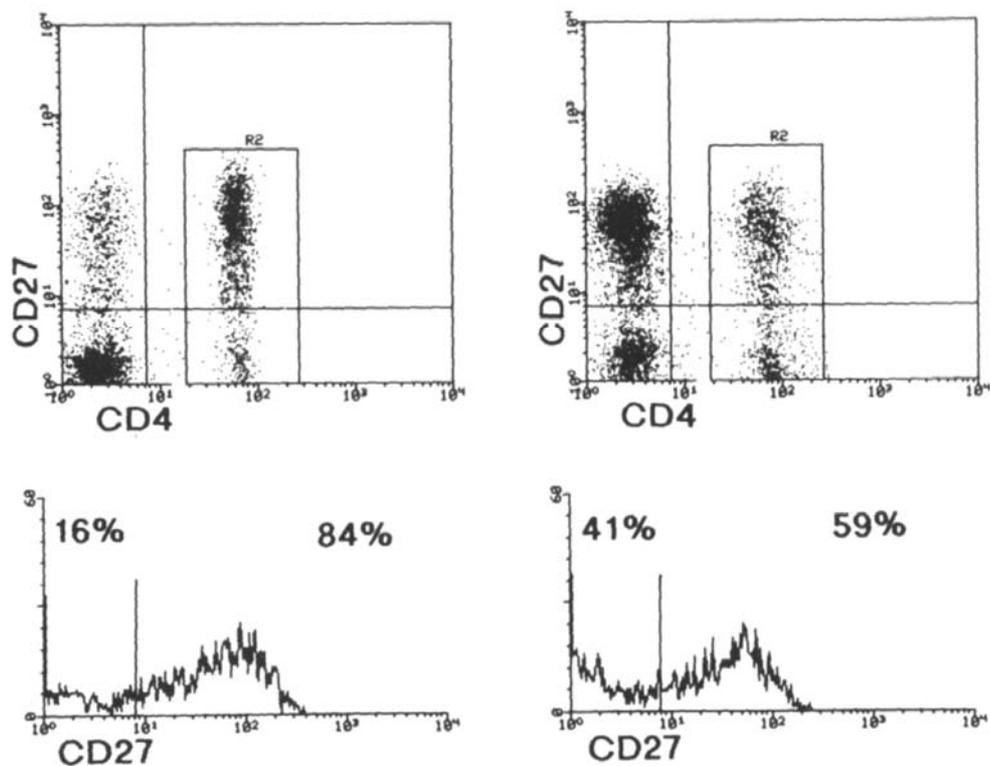


FIGURA 1 - Expressão do CD4 e CD27 pelas células T do SP e LS em AR. Células T CD4⁺ foram isoladas nos retângulos R₂ (superior) e a expressão do CD27 foi analisada (inferior). Valores nos histogramas indicam a percentagem das células CD27⁺ (valores à direita) ou das células CD27⁻ (valores à esquerda) para amostras pareadas de 1 paciente representativo com AR. Os dados são representativos da coloração realizada em 9 pares de SP e LS ⁽¹³⁾.

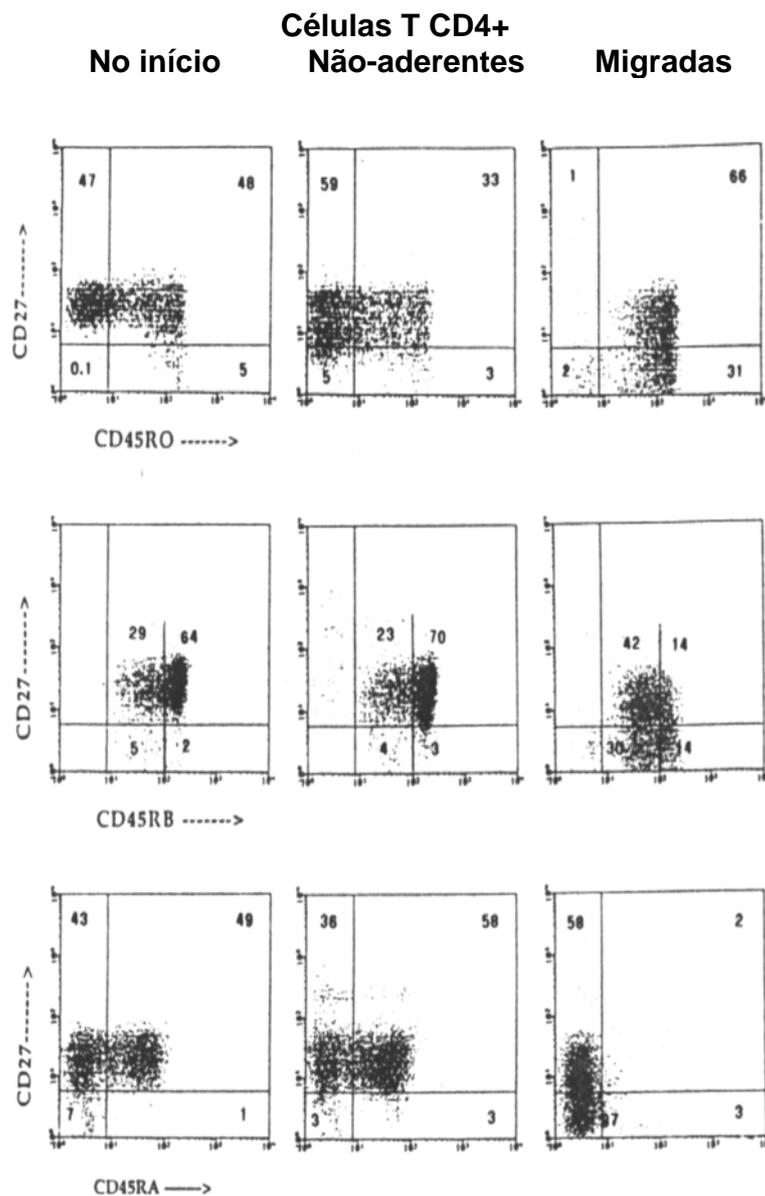


FIGURA 2 - Expressão do CD27 por células T CD4+ normais (não-AR) e que expressam o CD45RO (superior), CD45RB (centro) e CD45RA (inferior), antes e após a migração transendotelial em um ensaio *in vitro*. As linhas verticais no painel central dividem as populações de células CD45RB^{bright} e CD45RB^{dim}, enquanto que os valores demonstrados representam a percentagem de células CD27+ e CD27- para cada uma das duas subpopulações. Nos painéis superiores e nos inferiores os valores são percentagem de células em cada um dos quadrantes deste experimento representativo. Dados demonstrados são de 1 de 3 experimentos semelhantes ⁽¹³⁾.

ARTIGO EM INGLÊS

THE CHEMOKINE RECEPTOR CCR5 GENETIC POLYMORPHISM AND EXPRESSION IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Charles Lubianca Kohem¹, João Carlos Tavares Brenol², Ricardo Machado Xavier³, Markus Bredemeier⁴, Claiton Viegas Brenol⁵, Tiago Luís Dedavid e Silva⁶, Aline de Castilhos Mello⁷, Andres Delgado Cañedo⁸, Andrei Gibbon Nunes⁹, José Artur Bogo Chies¹⁰.

Partially supported by FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

¹ Master in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, and PhD student in the same Program.

² PhD in Medicine: Medical Sciences, UFRGS. Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.

³ PhD in Immunology, Shimane University, Japan. Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.

⁴ Master in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, and PhD student in the same Program.

⁵ Master student in the Post-graduation Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS.

⁶ Resident in the General Surgery Service, HCPA.

⁷ Bachelor in Biological Sciences, PUCRS.

⁸ PhD in Genetics and Molecular Biology, UFRGS. Post-doc student in the Genetics Department, UFRGS.

⁹ Graduate student in Biological Sciences, UFRGS.

¹⁰ PhD in Life Sciences – Immunology, Paris VI University. Assistant Professor in the Genetics Department, UFRGS.

Address reprint request and correspondence to João Carlos Tavares Brenol, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos, 2350, Porto Alegre, Brasil.

E-mail: jbrenol@hcpa.ufrgs.br

Objective: To identify the CCR5 genetic polymorphism (the $\Delta 32$ allelic variant) in RA patients, and compare the findings with healthy controls.

To compare the CCR5 phenotypic expression in T cells and monocytes isolated from the peripheral blood and synovial fluid in a subgroup of the RA patients.

Methods: The CCR5 genes of 92 RA patients and of 160 healthy controls were genotyped at the CCR5 gene using specific primers flanking the region of deletion. The ethnical distribution was similar between the two groups.

A flow cytometric analysis was undertaken for the immunophenotyping of T cells and monocytes isolated from the peripheral blood and synovial fluid of 8 RA patients. The isolated cells were triple stained with CD4 or CD8, CD25 (activation marker) and CCR5 monoclonal antibodies.

Results: There was no difference in the CCR5 $\Delta 32$ genotypic frequency between the RA patients and the control group (0,055 and 0,063 respectively, $p=0,989$). No homozygote for the CCR5 $\Delta 32$ allele was seen in both groups. Five heterozygotes were identified in the RA patient group, whose disease was characterized by the presence of the rheumatoid factor, radiographic erosions, joint deformities and extra-articular manifestations.

A significant enrichment of activated CCR5⁺ monocytes in the synovial fluid compared to the peripheral blood was seen by the phenotypic analysis of the RA patients. The RA patients subjected to arthrocentesis were all homozygotes for the CCR5 wild-type genotype.

Conclusion: A protective role for the CCR5 allelic variant in the RA development was not observed in the studied population. The disease severity in the heterozygote patients suggests that other pro-inflammatory mechanisms might overcome this mutation *in vivo*.

The activated CCR5+ monocyte enrichment in the rheumatoid synovial fluid might indicate that this cell population has an important role in the disease pathogenesis.

Key words: chemokines, rheumatoid arthritis, CCR5 polymorphism.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease of unknown etiology [1, 2] with articular and systemic manifestations, whose prevalence is estimated at 1% of the Brazilian and world's adult population [3, 4]. It is clinically characterized by chronic symmetric and erosive peripheral synovitis, with articular deformity and destruction leading to progressive functional incapacity. Although the etiologic stimulus remains unknown, RA is distinguished by the intense T cell and monocyte synovial infiltration in a perivascular distribution [2, 5].

Previous studies have already characterized the T cell population present in RA synovial compartments as CD4+ activated and terminally differentiated memory cells, with an enhanced transendothelial migratory capacity [6-8]. This capacity influences its recruitment from the peripheral blood to the rheumatoid synovial

membrane through complex and finally regulated cellular interactions, where chemoattractive cytokines (chemokines) have an important role.

The chemokines promote leukocyte chemotaxis, adhesion and penetration through endothelial cells. They work by binding to specific receptors present in the cellular membrane of these leukocytes [9]. In RA specifically, the CCR5 serves as the receptor for the chemokines RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β and it seems to be implicated in the monocyte/macrophage and Th1 CD4+ T cells chemoattraction to the synovial membrane [10-14].

The 32 base-pair deletion in the CCR5 gene (CCR5 Δ 32 allele) abolishes the receptor expression in homozygotes, while heterozygotes express it less intensely. Zapico et al [15] and Patel et al [16] have described that CCR5 Δ 32 allele heterozygote RA patients would have a less severe disease, while homozygotes would be protected from developing it. Other studies corroborate the hypothesis that the CCR5 genetic polymorphism seems to modulate RA's clinical severity [17-20].

Taken together, these evidences point to a CCR5 important role in the trafficking of inflammatory response cells from the peripheral circulation to the rheumatoid synovial membrane. Thus, this receptor selective blocking would be a new therapeutic target in RA. *In vitro* and animal RA model studies have already shown promising results with this biologic therapy [21-26]. A first study in humans with RA has also shown that a chemokine receptor antagonism might be beneficial [27].

Since the study of the CCR5 genetic polymorphism in RA has no precedent in Brazil, these analyses in patients were compared to healthy volunteers. In a subgroup of the RA patients, a comparative immunophenotypic analysis of monocytes and T cells isolated from the peripheral blood and synovial fluid was done.

Patients and methods

In this study, 92 adult (older than 16 years) RA patients classified according to the American College of Rheumatology classification criteria [28] who were followed at the Rheumatology Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) were studied. These patients were consecutively included in the study irrespective of their inflammatory disease activity, from January 2003 to June 2004. Peripheral blood samples were collected from these patients, as well as from 160 healthy volunteer blood donors who constituted the control group.

In the same period of time, 8 RA patients presenting with a swollen knee, where therapeutic arthrocentesis was indicated, were included in the study. The immunophenotypic analysis was then conducted, comparing monocytes and T cells from the peripheral blood and synovial fluid from these patients.

This study was approved by the Institutional Ethics Committee and all subjects gave their written informed consent.

After genomic DNA extraction from the peripheral blood was done according to the method described by Lahiri and Nurnberger [29], polymerase chain reaction

(PCR) amplification of a region of the CCR5 gene containing the delta32 deletion was performed, utilizing the 5'GGTCTTCATTACACCTGC3' as the sense primer and 5'AGGATTCCCGAGTAGCAGATG3' as the antisense primer. The PCR was performed under the following conditions: 94°C for 3 minutes, 94°C for 30 seconds, 60°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute for 35 cycles, and then 72°C for 5 minutes. The PCR products were electrophoresed on ethidium bromide-stained 3% agarose gels and visualized under ultraviolet light. The PCR amplification results in a 137bp fragment when the normal CCR5 allele is present, whereas the deleted variant generates a 105bp fragment.

For the immunophenotyping analysis of the peripheral blood and synovial fluid, the mononuclear cells were initially isolated by centrifugation under a Ficoll-Hypaque (Gibco, Gaithersburg, Maryland) density gradient. The cells were microscopically (100X) counted and their viability always exceeded 95% by the trypan blue exclusion method (Sigma, St Louis, Missouri).

The cell immunophenotyping was carried out by a direct immunofluorescence assay. CD4, CD8, CD25 and CCR5 specific monoclonal antibodies and isotype-matched antibody controls were purchased from Becton Dickinson (San Jose, California). FITC, PE and Texas-red monoclonal antibodies were added to 12 X 75 mm test-tubes for the cell triple-staining.

The flow cytometric analysis was done with a FACScalibur equipment and utilized the CellQuest software (Becton Dickinson). The compensation parameters for multiparametric studies were initially adjusted, and data from 10.000 events per sample were acquired with appropriate lymphocyte and monocyte gates.

Statistical analysis

The results were calculated using 2 X 2 contingency tables and the two groups were compared using the chi-square test with the Yates' correction. The odds ratio and 95% confidence intervals were calculated to verify the association between the CCR5 Δ 32 allele and rheumatoid arthritis.

Wilcoxon's signed rank test was used for the CCR5 phenotypic expression comparison in T cells and monocytes in paired samples of RA patients' peripheral blood and synovial fluid.

For statistical significance we considered a $p < 0.05$.

Results

There was no difference in the CCR5 Δ 32 genotypic frequency between RA patients and the control group [OR= 0,86 (0,25-2,86), $p=0,989$]. The genotype and allelic frequencies of RA patients and controls are summarized in **Table 1**. No CCR5 Δ 32 homozygote was found in either the RA patient or control group.

In the RA patient group we found only five heterozygotes for the CCR5 Δ 32 allele. In all these cases the disease was very aggressive, with high titer

rheumatoid factor, many radiographic bone erosions, joint deformities and the presence of *pannus*, all associated with secondary Sjögren's syndrome.

Among the 8 patients whose synovial fluid was obtained for comparative immunophenotypic analysis with the peripheral blood, all were homozygotes for the wild-type genotype.

The flow cytometric immunophenotypic analysis utilized a triple-staining technique for the comparison between RA patients' peripheral blood and synovial fluid. The T cells were stained with either CD4/CD25/CCR5 or CD8/CD25/CCR5 and the monocytes with CD25/CCR5.

There was no statistical difference in the T cell immunophenotyping comparisons between the peripheral blood and synovial fluid; however, there was a non-significant percentual increment in the synovial fluid activated (CD25+) CCR5+ CD4+ T cells, when compared to the peripheral blood (**Table 2**).

There was a significant enrichment in activated (CD25+) CCR5+ monocytes in the RA patients' synovial fluid, when compared to the peripheral blood (**Table 2 and Figure 1**). It is important to emphasize that CD25+/CCR5+ monocytes were not detected in the peripheral blood of seven of the eight studied patients, and in the single patient where that was seen the percentual was extremely low (1,53%). In contradiction, monocytes with that immunophenotype in the synovial fluid were found in all the patients except one, and the proportion achieved 41,6% in one of the patients.

Discussion

Rheumatoid arthritis is still today, despite all the advances in the knowledge of its physiopathogenesis, a disease of unknown cause and treatment far from the ideal.

It is a relatively prevalent disease with a worldwide distribution, whose patients suffer from chronic pain, functional incapacity and early mortality. These factors bring serious social and economic losses. That justifies the intense research efforts to uncover the disease etiology and consequently allow more efficient therapies to be applied.

RA is a disease of genetic influence, with an equally or even more important role for the environmental component, where immune response cells are peripherally activated and posteriorly attracted to the synovial compartment.

A previous study, showing that the rheumatoid synovium is enriched with activated and terminally differentiated CD4⁺ memory T cells with an enhanced transendothelial migratory capacity [8], should be emphasized. Although its cause is still mysterious, it is well known that specific subgroups of lymphomononuclear cells are the main effectors in RA pathogenesis. These cells are well equipped with surface molecules that allow them to adhere and migrate through the vascular endothelium (adhesion molecules), leaving the peripheral circulation and arriving at the rheumatoid synovial membrane. That is the site where they will cause all the inflammation and tissue damage that is so characteristic of the disease.

The role carried out by certain chemoattractive and proinflammatory cytokines (chemokines), that upon binding to surface receptors attract and direct these lymphomononuclear cells to the rheumatoid synovium, is fundamental as well. Thus, the selective expression of chemokine receptors will determine which cells will be present in inflammatory sites. Many previous studies have shown that the rheumatoid synovium is enriched with T cells and monocytes expressing the chemokine receptor CCR5 [10-14].

The expected enrichment with CD4+/CCR5+ T cells in the rheumatoid synovial fluid was not found. That probably occurred because of the small number of patients studied (type II or β statistical error), since the numbers of those cells were augmented in the synovial fluid, but not reaching statistical significance. Another hypothesis that could explain this finding is the well known fact that the chemokine receptors, when activated by their ligands, are directed to the cell interior [30]. After this internalization, some of these receptors recycle back to cell membrane, while others are degraded in the lysosomal compartments. Thus, we may have not detected the CCR5 in the rheumatoid synovial fluid activated T cells because the receptor was inside the cell, and not expressed in the surface membrane.

However, an enrichment with activated (CD25+) CCR5+ monocytes was observed in the rheumatoid synovial fluid when compared to the peripheral blood. That finding confirms, in the studied population, what many previous studies had already observed ⁽¹⁰⁻¹⁴⁾. Among those studies, the one by Kawanaka et al ⁽¹²⁾, describing an enrichment with CD16+ (Fc γ) monocytes in RA patients' synovial

fluid, should be emphasized. Those monocytes expressed CCR1, CCR5 and ICAM-1 in high levels. The authors conclude that these monocytes maturation into CD16+ “tissue infiltrating” cells might contribute to RA’s persistent joint inflammation.

The CCR5 Δ 32 allelic variant protective role for the development or severity of RA was not observed in this study, as suggested by previous studies ^(15, 17, 20). We could not find a difference between the two populations in terms of the heterozygote frequency, and no homozygote for the CCR5 Δ 32 allelic variant was identified. The fact that both studied subpopulations (rheumatoid patients and healthy volunteers) showed a similar ethnic distribution must be stressed. This is very important in genetic studies, since the genotypic variability among distinct races is a well known fact.

The observation that the five CCR5 Δ 32 heterozygote RA patients had a very aggressive disease is worth emphasizing, in spite of its anecdotic character. It argues against the possible clinical modulating role that the CCR5 genetic polymorphism could have, suggesting that other RA proinflammatory mechanisms might overcome this mutation’s alleged protective role. Although unexpected, this is not an original finding, since John et al [31] also did not find a clinically protective role for the CCR5 Δ 32 in their studied population of RA patients.

Another still very plausible hypothesis to the findings resides in the chemokine network working mechanism itself. That is a collection of cytokines and cell receptors very promiscuous and frequently redundant, where the partial or total absence of one member can be replaced by another [32].

Recent studies seem to be very elucidating and help to understand the findings of the present work. A previous study had already shown the CXCR6+ (CXCL16 chemokine receptor) T cell enrichment in the synovial fluid of RA patients [33]. Posteriorly, van der Voort et al [34] demonstrated that the enhanced CXCL16 chemokine expression in synovial macrophages contributes to the recruitment of memory CXCR6+ T cells to the rheumatoid joint. In this same study, the authors also investigate the *in vivo* TNF role in the CXCL16 expression. To accomplish that, they utilized six synovial membrane biopsies from patients subjected to anti-TNF therapy. Before treatment, all the tissue samples intensely express the CXCL16. After anti-TNF therapy, the samples from the 3 responding patients dramatically decreased the CXCL16 expression, while in the 3 “non-responders” it was unaltered. This extremely interesting finding shows that one of the beneficial effects of the anti-TNF therapy currently used for RA treatment occurs through the chemokine network blockade. As previously mentioned, these data confirm once again the importance of monocytes/macrophages in RA’s physiopathogenesis, the fact that the chemokines are redundant molecules, and help to understand why CCR5 Δ 32 heterozygotes may develop a severe rheumatoid disease.

In conclusion, a protective role for the CCR5 allelic variant in the RA development was not observed in the studied population. The diseases severity in the heterozygote patients suggests that other pro-inflammatory mechanisms might overcome this mutation *in vivo*. The activated CCR5+ monocyte enrichment in the rheumatoid synovial fluid might indicate that this cell population has an important role in the disease pathogenesis.

Table 1- Genotype and allelic frequencies of CCR5 and CCR5 Δ 32 in rheumatoid arthritis (RA) patients and controls

	<u>Controls</u>		<u>RA</u>	
	n	freq	n	freq
Genotype				
CCR5/CCR5	150	0.937	87	0.945
CCR5/CCR5 Δ 32	10	0.063*	5	0.055*
Total	160	1.000	92	1.000
Allele				
CCR5	310	0.969	179	0.973
CCR5 Δ 32	10	0.031 [¶]	5	0.027 [¶]
Total	320	1.000	184	1.000

Comparisons used the qui-square test with the Yates' correction

* p=0.989 for the comparison between genotype frequencies.

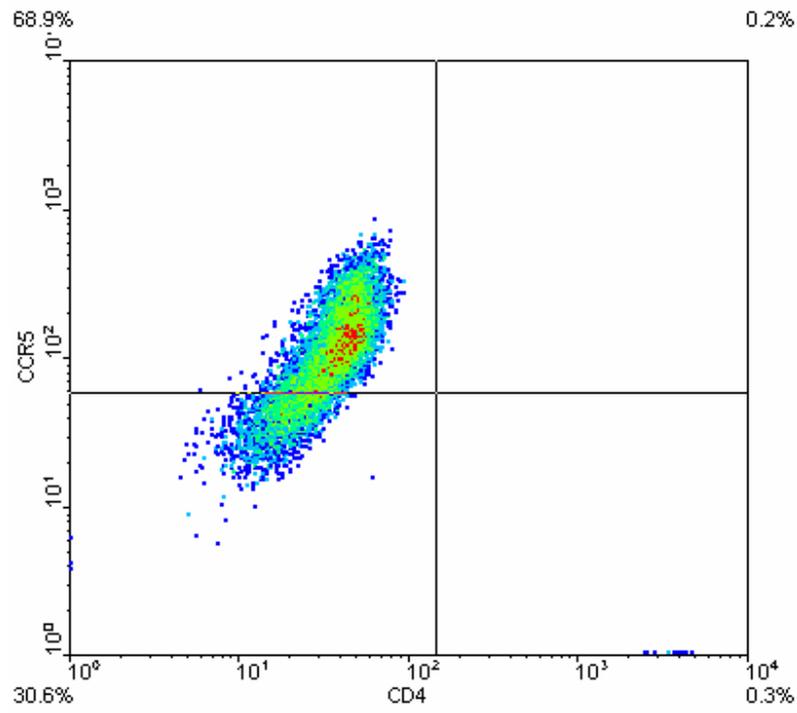
[¶] p=0.990 for the comparison between allele frequencies.

Table 2- Comparative analysis of the expressed surface antigens in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients (numbers represent the percentage of cells)

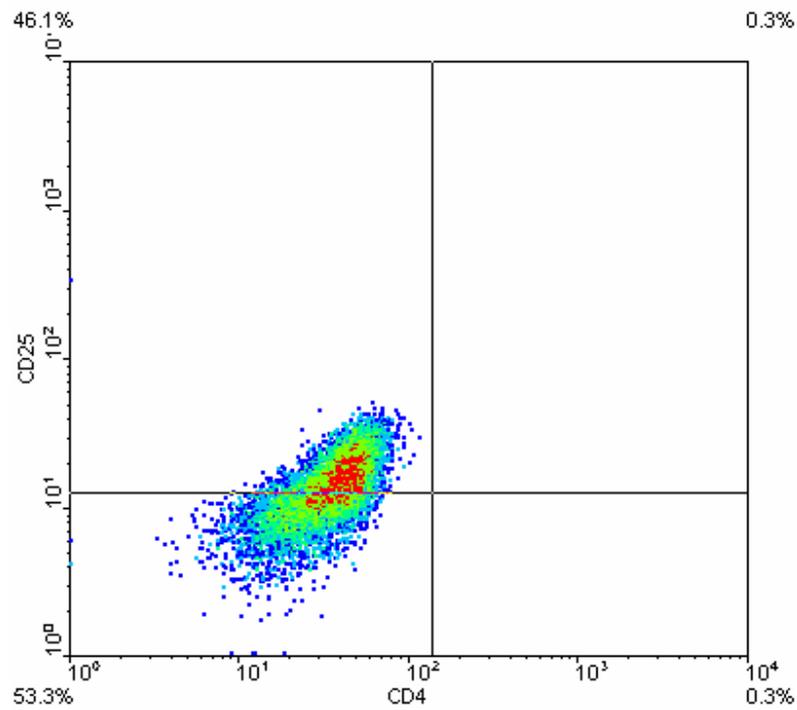
Surface antigens	Peripheral Blood	Synovial Fluid	P
1. T cells	Median (IQR)	Median (IQR)	
CD4+ / CD25+ / CCR5+	0.43 (0.06-1.22)	0.96 (0.05–3.85)	0.326
CD4+/CD25+/CCR5-	0.95(0.14-31.01)	10.26(0.13-43.35)	0.779
CD4+/CD25-/CCR5+	3.11(0.15-72.21)	23.90(5.97-72.35)	0.401
CD4+/CD25-/CCR5-	33.92(0.32-77.45)	16.93(1.68-57.99)	0.735
CD8+/CD25+/CCR5+	0.19(0.02-0.46)	0.25(0.07-0.53)	0.237
CD8+/CD25+/CCR5-	0.62(0.01-22.02)	9.93(0.11-67.48)	0.123
CD8+/CD25-/CCR5+	3.02(0.08-24.59)	5.95(1.39-32.89)	0.123
CD8+/CD25-/CCR5-	71.72(21.38-91.10)	49.78(4.89-94.49)	0.263
2.Monocyte CD25+/CCR5+	0	4.10(0.12-11.02)	0.043

IQR= interquartile range

Comparisons used the Wilcoxon's signed rank test



Monocytes CD4 vs CCR5 in synovial fluid



Monocytes CD4 vs CD25 in synovial fluid

Figure 1-Comparative immunophenotypic analysis of the peripheral blood *versus* synovial fluid from a rheumatoid arthritis patient

References

1. Utzinger PD, Z.N., Ehrlich GE, *Rheumatoid arthritis, Etiology, Diagnosis and Treatment*. 1985: JB Lippincott Co. 934.
2. Harris, E.D., Jr., *Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy*. N Engl J Med, 1990. **322**(18): p. 1277-89.
3. Wolfe, A.M., *The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys*. Bull Rheum Dis, 1968. **19**(2): p. 518-23.
4. Marques Neto, J.F., Gonsalves, H.T. et al., *Estudo multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatóide do adulto em amostras da população brasileira*. Revista Brasileira de Reumatologia, 1993. **33**: p. 169-73.
5. Cush, J.J. and P.E. Lipsky, *Cellular basis for rheumatoid inflammation*. Clin Orthop Relat Res, 1991(265): p. 9-22.
6. Thomas, R., et al., *Rheumatoid synovium is enriched in CD45RBdim mature memory T cells that are potent helpers for B cell differentiation*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(12): p. 1455-65.
7. Cush, J.J. and P.E. Lipsky, *Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(10): p. 1230-8.
8. Kohem, C.L., et al., *Enrichment of differentiated CD45RBdim,CD27-memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(5): p. 844-54.

9. Ward, S.G., K. Bacon, and J. Westwick, *Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction*. *Immunity*, 1998. **9**(1): p. 1-11.
10. Suzuki, N., et al., *Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis*. *Int Immunol*, 1999. **11**(4): p. 553-9.
11. Nissinen, R., et al., *CCR3, CCR5, interleukin 4, and interferon-gamma expression on synovial and peripheral T cells and monocytes in patients with rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2003. **30**(9): p. 1928-34.
12. Kawanaka, N., et al., *CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(10): p. 2578-86.
13. Katschke, K.J., Jr., et al., *Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(5): p. 1022-32.
14. Mack, M., et al., *Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(5): p. 981-8.
15. Zapico, I., et al., *CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis*. *Genes Immun*, 2000. **1**(4): p. 288-9.
16. Patel, D.D., J.P. Zachariah, and L.P. Whichard, *CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium*. *Clin Immunol*, 2001. **98**(1): p. 39-45.
17. Garred, P., et al., *CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 1998. **25**(8): p. 1462-5.

18. Gomez-Reino, J.J., et al., *Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(5): p. 989-92.
19. Wedderburn, L.R., et al., *Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(4): p. 765-74.
20. Pokorny, V., et al., *Evidence for negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(3): p. 487-90.
21. Kasama, T., et al., *Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(6): p. 2868-76.
22. Barnes, D.A., et al., *Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(12): p. 2910-9.
23. Yang, Y.F., et al., *A non-peptide CCR5 antagonist inhibits collagen-induced arthritis by modulating T cell migration without affecting anti-collagen T cell responses*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(8): p. 2124-32.
24. Vierboom, M.P., et al., *Inhibition of the development of collagen-induced arthritis in rhesus monkeys by a small molecular weight antagonist of CCR5*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(2): p. 627-36.
25. Szekanecz, Z., J. Kim, and A.E. Koch, *Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis*. *Semin Immunol*, 2003. **15**(1): p. 15-21.

26. Bruhl, H., et al., *Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2420-6.
27. Haringman, J.J., et al., *Chemokine blockade and chronic inflammatory disease: proof of concept in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(8): p. 715-21.
28. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
29. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
30. Proudfoot, A.E., *Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 106-15.
31. John, S., et al., *Genetic variation in CCR5 does not predict clinical outcome in inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(12): p. 3615-6.
32. Christopherson, K., 2nd and R. Hromas, *Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 388-96.
33. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(1): p. 6-15.
34. van der Voort, R., et al., *Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(5): p. 1381-91.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

ESTUDO DO POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DO CCR5 EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE

Charles Lubianca Kohem¹, João Carlos Tavares Brenol², Ricardo Machado Xavier³, Markus Bredemeier⁴, Claiton Viegas Brenol⁵, Tiago Luís Dedavid e Silva⁶, Aline de Castilhos Mello⁷, Andres Delgado Cañedo⁸, Andrei Gibbon Neves⁹, José Artur Bogo Chies¹⁰.

Financiado parcialmente pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

¹ Mestre em Medicina: Ciências Médicas pela UFRGS e Doutorando do mesmo Programa.

² Doutor em Medicina: Ciências Médicas pela UFRGS. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da UFRGS.

³ Doutor em Imunologia pela Universidade de Shimane, Japão. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da UFRGS.

⁴ Mestre em Medicina: Ciências Médicas pela UFRGS e Doutorando do mesmo Programa.

⁵ Mestrando do PPG em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS.

⁶ Médico residente do Serviço de Cirurgia Geral do HCPA.

⁷ Bacharel em Ciências Biológicas pela PUC/RS.

⁸ Doutor em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS. Pós-doutorando no Departamento de Genética da UFRGS.

⁹ Graduando em Ciências Biológicas pela UFRGS.

¹⁰ Doutor em Ciências da Vida, especialidade de Imunologia, pela Universidade de Paris VI. Professor Adjunto do Departamento de Genética da UFRGS.

Endereço para cópias e correspondência sobre o artigo para João Carlos T. Brenol, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos, 2350, Porto Alegre, Brasil.

E-mail: jbrenol@hcpa.ufrgs.br

Objetivo: Identificar o polimorfismo genético do receptor de quimiocinas CCR5 (variante alélica $\Delta 32$) em pacientes com AR, comparando os achados com os de voluntários sadios.

Comparar a expressão fenotípica do CCR5 de linfócitos T e monócitos do sangue periférico com a do líquido sinovial em um subgrupo dos pacientes com AR.

Métodos: Para a genotipagem do CCR5, um segmento do gene de 92 pacientes com AR e de 160 controles sadios foi amplificado usando *primers* específicos que se ligam a regiões flangeadoras da região de deleção. A distribuição étnica entre os dois grupos foi semelhante.

Para a imunofenotipagem de linfócitos T e monócitos obtidos do sangue periférico e líquido sinovial de 8 pacientes com AR, utilizou-se a análise por citometria de fluxo. Para tal, as células foram marcadas com tripla coloração com os anticorpos monoclonais CD4 ou CD8, CD25 (marcador de ativação celular) e CCR5.

Resultados: Não houve diferença na frequência genotípica do CCR5 $\Delta 32$ entre os pacientes com AR e o grupo controle (0,055 e 0,063 respectivamente, $p=0,989$). Não foi encontrado homozigoto para o alelo CCR5 $\Delta 32$ em nenhum dos grupos. Entre os pacientes com AR, foram vistos 5 casos heterozigotos, que se

caracterizaram por doença erosiva, fator reumatóide positivo, muita deformidade articular e manifestações extra-articulares.

A análise imunofenotípica mostrou um enriquecimento significativo de monócitos ativados CCR5+ no líquido sinovial em comparação com o sangue periférico dos pacientes com AR. Todos estes pacientes submetidos a artrocentese foram homocigotos para o genótipo *wild-type* do CCR5.

Conclusão: Não se observou um papel protetor da variante alélica CCR5 Δ 32 para o desenvolvimento da AR na população estudada. A gravidade da doença nos pacientes heterocigotos para esta mutação sugere que outros mecanismos pró-inflamatórios podem sobrepujá-la *in vivo*.

O enriquecimento de monócitos ativados CCR5+ no líquido sinovial reumatóide pode indicar que estas células tenham importante papel na patogênese da doença.

Palavras-chave: quimiocinas, artrite reumatóide, polimorfismo CCR5.

Introdução

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica auto-imune com manifestações articulares e sistêmicas, de etiologia desconhecida [1,2], cuja prevalência é estimada em 1% da população adulta mundial e brasileira [3,4]. Caracteriza-se clinicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva de

articulações periféricas, cuja evolução geralmente determina destruição e deformidade articular, com conseqüente incapacidade funcional.

Embora o estímulo etiológico seja desconhecido, sabe-se que a AR se distingue pela intensa infiltração da membrana sinovial por linfócitos T e monócitos, geralmente em uma distribuição perivascular [2,5].

Estudos prévios já caracterizaram a população de linfócitos T presentes nos compartimentos sinoviais da AR como células CD4+ de memória, ativadas e terminalmente diferenciadas, com uma capacidade aumentada para a migração transendotelial [6-8]. Esta capacidade propicia seu recrutamento do sangue periférico para a membrana sinovial reumatóide, através de interações celulares complexas e finamente reguladas, onde citocinas quimioatrativas (quimiocinas) têm um papel importante.

As quimiocinas promovem a quimiotaxia, adesão e penetração de leucócitos através de células endoteliais. Elas atuam a partir de sua ligação a receptores específicos, presentes na membrana celular destes leucócitos [9]. No caso específico da AR, o receptor CCR5 das quimiocinas RANTES e MIP-1 α e β parece estar implicado na quimioatração de monócitos/macrófagos e linfócitos T CD4+ com fenótipo Th1 para a membrana sinovial [10-14].

A deleção de 32 pares de bases no gene do CCR5 (alelo CCR5 Δ 32) abole a expressão do receptor em homozigotos, enquanto heterozigotos o expressam de forma menos intensa. Zapico e cols. [15] e Patel e cols. [16] identificaram que pacientes com AR heterozigotos para o alelo CCR5 Δ 32 teriam doença mais branda e homozigotos estariam protegidos de desenvolvê-la. Outros estudos

corroboraram a hipótese de que o polimorfismo genético do CCR5 parece modular a severidade clínica da AR [17-20].

Este conjunto de evidências aponta para a importância do CCR5 no tráfego de células de resposta inflamatória da circulação periférica à membrana sinovial reumatóide. A partir disto, o bloqueio seletivo deste receptor poderia ser um novo alvo para a intervenção terapêutica na AR. Estudos *in vitro* ou em modelos animais de AR já mostraram resultados promissores desta terapia biológica [21-26]. Um primeiro estudo em humanos com AR também demonstrou que o antagonismo de um receptor de quimiocinas pode ser benéfico [27].

Uma vez que o estudo do polimorfismo genético do CCR5 em AR é inédito no Brasil, foi realizada a análise deste polimorfismo em pacientes com a doença e os achados comparados com voluntários saudáveis. Além disto, em um subgrupo de pacientes, foi realizada a análise imunofenotípica comparativa de linfócitos T e monócitos do sangue periférico e do líquido sinovial.

Pacientes e Métodos

Foram estudados 92 pacientes adultos (maiores de 16 anos) portadores de AR segundo os critérios de classificação do *American College of Rheumatology* [28], atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Estes pacientes foram incluídos no trabalho de forma consecutiva, independentemente do grau de atividade inflamatória da doença, no período de

janeiro de 2003 a junho de 2004. Uma amostra de sangue periférico destes pacientes foi coletada, bem como de 160 doadores voluntários sadios que constituíram o grupo controle.

No mesmo período, 8 pacientes com AR que apresentaram derrame articular no joelho, com indicação terapêutica de artrocentese, foram alocados ao estudo para a análise imunofenotípica comparativa de linfócitos T e monócitos do sangue periférico e líquido sinovial.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética institucional e todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

O DNA do sangue periférico foi extraído de acordo com o método descrito por Lahiri e Nurnberger [29], sendo após realizada uma amplificação da região contendo a deleção delta32 por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Utilizaram-se os *primers* específicos senso 5'GGTCTTCATTACACCTGC3' e antisenso 5'AGGATTCCCGAGTAGCAGATG3' da seguinte forma: 1 µl de DNA (0,2-0,5 µg), 2,5 µl de tampão 10X contendo 30 mM de dNTP e 10 pmol de cada *primer* (volume total da reação de 25 µl). A PCR foi realizada da seguinte forma: 94 °C por 3 minutos, 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto, e 72 °C por 1 minuto por 35 ciclos, e então 72 °C por 5 minutos. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. O resultado da amplificação da PCR foi um fragmento de 137 pb quando um alelo normal do CCR5 estava presente, enquanto a variante com deleção originou um fragmento de 105 pb.

Para as análises de imunofenotipagem do sangue periférico e líquido sinovial, inicialmente isolaram-se células mononucleares por centrifugação com gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque (Gibco, Gaithersburg, Maryland). As células foram contadas por meio de microscopia (100X) e sua viabilidade sempre excedeu 95%, a julgar por sua capacidade de excluir o corante *trypan blue* (Sigma, St. Louis, Missouri).

A imunofenotipagem das células isoladas foi realizada através de uma técnica de imunofluorescência direta. Anticorpos monoclonais específicos para CD4, CD8, CD25 e CCR5, e os controles de isotipos apropriados, foram adquiridos da Becton Dickinson (San Jose, California). Para a tripla-coloração, anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína isotiocianato (FITC), ficoeritrina (PE) e Texas Red foram adicionados a tubos-teste de 12 X 75 mm.

A análise por citometria de fluxo foi realizada através do aparelho FACScalibur com o software CellQuest (Becton Dickinson). Os parâmetros de compensação para estudos multiparamétricos foram ajustados no início das análises, e os dados de 10.000 eventos por amostra foram adquiridos com *gates* aplicados aos linfócitos e monócitos.

Análise estatística

Os resultados foram analisados em tabelas de contingência 2 X 2 , e a comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste do qui-quadrado com correção de Yates. A razão de chances (odds ratio) e intervalo de confiança de 95% foram calculados para avaliar a associação entre a presença do alelo CCR5 Δ 32 e artrite reumatóide.

O teste de Wilcoxon foi utilizado para a comparação da expressão fenotípica do CCR5 em linfócitos T e monócitos de amostras pareadas de sangue periférico e líquido sinovial dos pacientes com AR.

Para significância estatística foi considerado um $p < 0,05$.

Resultados

Não houve diferença na freqüência genotípica do CCR5 Δ 32 entre os pacientes com AR e o grupo controle [OR=0,86 (0,25-2,86), $p= 0,989$]. O genótipo e a freqüência alélica dos pacientes com AR e controles estão sumarizados na **Tabela 1**. Nenhum indivíduo homozigoto para a deleção CCR5 Δ 32 foi encontrado no grupo com AR ou controle.

No grupo com AR encontramos apenas 5 pacientes heterozigotos para o alelo CCR5 Δ 32. Nestes 5 casos a doença se mostrou muito agressiva, com presença do fator reumatóide em altos títulos, múltiplas erosões ósseas ao raio-X

e clinicamente se expressando com a presença de *pannus* e muitas deformidades articulares, associados à síndrome de Sjögren secundária.

Dos 8 pacientes que tiveram líquido sinovial coletado para análise imunofenotípica comparativa com o sangue periférico, todos foram homozigotos para o genótipo *wild-type*.

As análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo utilizaram tripla coloração para a comparação do sangue periférico com o líquido sinovial dos pacientes com AR. Os linfócitos T foram marcados com CD4/CD25/CCR5 ou CD8/CD25/CCR5 e os monócitos com CD25/CCR5.

Não houve diferença estatística em nenhuma das comparações entre o sangue periférico e o líquido sinovial para o imunofenótipo dos linfócitos T, embora houvesse um aumento do percentual de linfócitos CD4+ ativados (CD25+) e CCR5+ no líquido sinovial, quando comparado ao sangue periférico (**Tabela 2**).

Houve um enriquecimento significativo de monócitos ativados (CD25+) CCR5+ no líquido sinovial destes pacientes com AR quando comparado ao sangue periférico (**Tabela 2 e Figura 1**). Cabe salientar que monócitos com o imunofenótipo CD25+/CCR5+ não foram detectados no sangue periférico de sete dos oito pacientes estudados, e no único paciente em que isto ocorreu a proporção foi extremamente baixa (1,53%). Já no líquido sinovial, monócitos com este imunofenótipo foram encontrados em todos os pacientes à exceção de um, tendo a proporção chegado a 41,6% em um dos pacientes.

Discussão

A artrite reumatóide permanece hoje, apesar de todo o avanço no conhecimento de sua fisiopatogênese, uma doença de causa desconhecida e de tratamento aquém do ideal.

Trata-se de uma patologia de prevalência relativamente comum e com distribuição mundial, cujos pacientes sofrem de dor e incapacitação funcional crônicas, com mortalidade precoce, gerando graves prejuízos sociais e econômicos. Isto justifica plenamente o intenso esforço de pesquisadores na descoberta da real etiopatogenia e conseqüente terapia mais eficaz para esta enfermidade.

A AR é uma doença de influência genética, com papel tão ou até mais importante para o componente ambiental, onde células de resposta imunológica são ativadas na periferia e posteriormente atraídas para o compartimento sinovial.

Cabe ressaltar a importância de estudo anterior, onde foi demonstrado que a sinóvia reumatóide é enriquecida de linfócitos T CD4+ de memória terminalmente diferenciados e ativados, com capacidade aumentada para migração transendotelial ⁽⁸⁾. Embora ainda hoje se desconheça a causa da doença, sabe-se que determinados subgrupos específicos de células linfomononucleares são os efetores em sua patogênese. Estas células são equipadas com moléculas de superfície que lhes permitem aderir e realizar a migração através do endotélio vascular (moléculas de adesão), saindo da corrente circulatória e chegando à membrana sinovial reumatóide, onde causam a inflamação e o dano tecidual característicos da doença.

É também fundamental o papel de determinadas citocinas quimioatrativas e pró-inflamatórias (quimiocinas), que a partir de sua ligação à receptores de

superfície, atraem e direcionam estas mesmas células linfomononucleares para a sinóvia reumatóide. A expressão seletiva de receptores de quimiocinas determina quais células vão estar presentes nos sítios de inflamação. Diversos estudos anteriores mostraram que a sinóvia reumatóide é enriquecida de linfócitos T e monócitos que expressam o receptor de quimiocinas CCR5 [10-14].

Não foi encontrado o esperado enriquecimento de linfócitos T CD4+ CCR5+ no líquido sinovial reumatóide. Provavelmente isto se deu pelo pequeno número de pacientes estudados (erro estatístico tipo II ou β), na medida em que se observou um aumento percentual destas células no líquido sinovial, porém sem significância estatística. Uma outra hipótese que poderia explicar este achado é o fato conhecido de que os receptores de quimiocinas, quando ativados por seus ligantes, se direcionam para o interior da célula [30]. Após esta internalização, alguns receptores de quimiocinas reciclam de volta à membrana celular, enquanto outros são degradados nos compartimentos lisossomiais. Portanto, podemos não ter detectado o CCR5 em linfócitos T ativados no líquido sinovial reumatóide porque este receptor poderia estar no interior da célula e não expresso na membrana celular destes linfócitos.

Foi observado, no entanto, um aumento percentual de monócitos ativados (CD25+) CCR5+ no líquido sinovial quando comparado ao sangue periférico dos pacientes reumatóides. Isto confirma, na população em estudo, o achado de diversos estudos prévios [10-14]. Entre estes estudos, cabe ressaltar o achado de Kawanaka et al [12], que observaram um aumento no percentual de monócitos CD16+ (receptor Fc γ) no líquido sinovial de pacientes com AR. Estes monócitos

expressavam níveis aumentados de CCR1, CCR5 e ICAM-1. Os autores concluem que a maturação de monócitos em células CD16+ “infiltradoras de tecidos” pode contribuir para a inflamação articular persistente da AR.

Não foi observado, neste estudo, o papel protetor para o desenvolvimento e/ou severidade da doença reumatóide atribuído à variante alélica CCR5 Δ 32 em vários estudos anteriores [15,17,20]. Isto porque não encontramos diferença na frequência de heterozigotos entre as duas populações, e nenhum homozigoto para o alelo variante CCR5 Δ 32 foi identificado. Deve-se salientar que ambas as subpopulações estudadas (pacientes reumatóides e voluntários sadios) apresentavam distribuição étnica semelhante. Este dado é muito importante em se tratando de estudo genético, uma vez que sabidamente existe variação genotípica entre diferentes etnias.

Cabe ressaltar, mesmo considerando o caráter anedótico da observação, o fato de que os cinco pacientes com AR heterozigotos para o CCR5 Δ 32 tivessem doença extremamente agressiva. Este achado fala contra a possível modulação clínica da doença pelo polimorfismo do CCR5 e sugere que outros mecanismos pró-inflamatórios característicos da AR possam sobrepujar este que seria um possível efeito benéfico desta mutação. Embora inesperado, este fato não é inédito, já que John et al [31] também não encontraram efeito clínico protetor para o CCR5 Δ 32 entre os pacientes com AR por eles estudados.

Ainda uma outra hipótese bastante plausível para o conjunto de achados reside no próprio sistema de funcionamento das quimiocinas. Trata-se de um conjunto de citocinas e receptores celulares bastante promíscuo e freqüentemente

redundante, onde a falta total ou parcial de um membro pode ser suprida por outro [32].

Estudos recentes parecem bastante elucidativos para o entendimento dos achados do presente estudo. Um trabalho prévio já havia mostrado a acumulação de linfócitos T CXCR6+ (receptor da quimiocina CXCL16) no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide [33]. Posteriormente, van der Voort et al [34] demonstraram que o aumento da expressão da quimiocina CXCL16 em macrófagos sinoviais contribui para o recrutamento de linfócitos T de memória CXCR6+ para a articulação reumatóide. Os autores neste estudo também investigam o papel do TNF *in vivo* na expressão do CXCL16. Para tal fim, utilizam biópsias de membrana sinovial de seis pacientes submetidos à terapia anti-TNF. Antes do tratamento, todas as amostras de tecido expressam intensamente o CXCL16. Após, as amostras dos 3 pacientes que responderam clinicamente ao tratamento reduziram significativamente a expressão do CXCL16, enquanto nos 3 não-respondedores a expressão ficou inalterada. Este achado extremamente interessante evidencia que um dos efeitos benéficos da terapia anti-TNF hoje utilizada na AR se dá pelo bloqueio do sistema de quimiocinas. Estes dados mais uma vez comprovam a importância de monócitos/macrófagos na fisiopatogenia da AR; o fato de que o sistema de quimiocinas é redundante; e ajudam a entender porque pacientes heterozigotos para o CCR5 Δ 32 podem desenvolver doença reumatóide grave.

Em conclusão, não se observou um papel protetor da variante alélica CCR5 Δ 32 para o desenvolvimento da AR na população estudada. A gravidade da

doença nos pacientes heterozigotos para esta mutação sugere que outros mecanismos pró-inflamatórios podem ser capazes de se sobrepor a ela. O enriquecimento de monócitos ativados CCR5+ no líquido sinovial reumatóide pode indicar que estas células tenham importante papel na patogênese da doença.

Tabela 1- Genótipo e frequência alélica do CCR5 e CCR5 Δ 32 em pacientes com artrite reumatóide (AR) e controles

	<u>Controles</u>		<u>AR</u>	
	n	freq	n	freq
Genótipo				
CCR5/CCR5	150	0,937	87	0,945
CCR5/ CCR5 Δ 32	10	0,063*	5	0,055*
Total	160	1,000	92	1,000
Alelo				
CCR5	310	0,969	179	0,973
CCR5 Δ 32	10	0,031 [¶]	5	0,027 [¶]
Total	320	1,000	184	1,000

As comparações utilizaram o teste do qui-quadrado com a correção de Yates

* p=0,989 para a comparação das frequências genotípicas.

[¶] p=0,990 para a comparação das frequências alélicas.

Tabela 2- Análise comparativa dos antígenos de superfície expressos no sangue periférico e líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (números representam o percentual de células)

Antígenos de superfície	Sangue periférico	Líquido Sinovial	P
1. Linfócitos T	Mediana (AIQ)	Mediana (AIQ)	
CD4+ / CD25+ / CCR5+	0,43 (0,06-1,22)	0,96 (0,05–3,85)	0,326
CD4+/CD25+/CCR5-	0,95(0,14-31,01)	10,26(0,13-43,35)	0,779
CD4+/CD25-/CCR5+	3,11(0,15-72,21)	23,90(5,97-72,35)	0,401
CD4+/CD25-/CCR5-	33,92(0,32-77,45)	16,93(1,68-57,99)	0,735
CD8+/CD25+/CCR5+	0,19(0,02-0,46)	0,25(0,07-0,53)	0,237
CD8+/CD25+/CCR5-	0,62(0,01-22,02)	9,93(0,11-67,48)	0,123
CD8+/CD25-/CCR5+	3,02(0,08-24,59)	5,95(1,39-32,89)	0,123
CD8+/CD25-/CCR5-	71,72(21,38-91,10)	49,78(4,89-94,49)	0,263
2.Monócito CD25+/CCR5+	0	4,10(0,12-11,02)	0,043

AIQ= amplitude interquartis

As comparações utilizaram o Teste de Wilcoxon

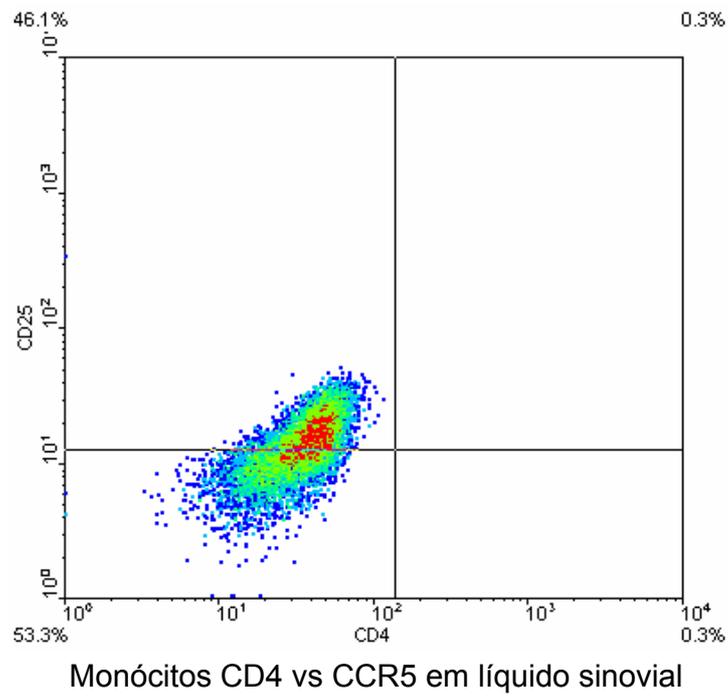
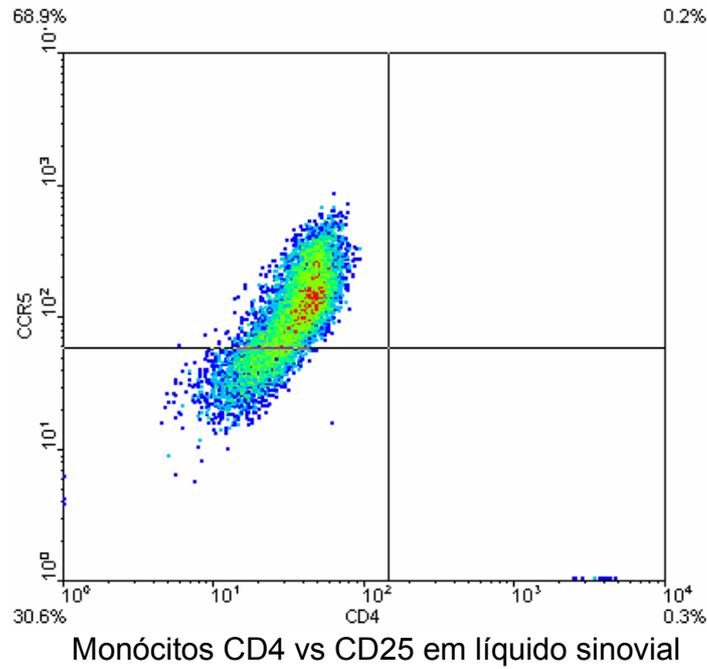


Figura 1-Análise imunofenotípica comparativa do sangue periférico com o líquido sinovial de paciente com artrite reumatóide

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Utzinger PD, Z.N., Ehrlich GE, *Rheumatoid arthritis, Etiology, Diagnosis and Treatment*. 1985: JB Lippincott Co. 934.
2. Harris, E.D., Jr., *Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy*. N Engl J Med, 1990. **322**(18): p. 1277-89.
3. Wolfe, A.M., *The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys*. Bull Rheum Dis, 1968. **19**(2): p. 518-23.
4. Marques Neto, J.F., Gonsalves, H.T. et al., *Estudo multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatóide do adulto em amostras da população brasileira*. Revista Brasileira de Reumatologia, 1993. **33**: p. 169-73.
5. Cush, J.J. and P.E. Lipsky, *Cellular basis for rheumatoid inflammation*. Clin Orthop Relat Res, 1991(265): p. 9-22.
6. Thomas, R., et al., *Rheumatoid synovium is enriched in CD45RBdim mature memory T cells that are potent helpers for B cell differentiation*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(12): p. 1455-65.
7. Cush, J.J. and P.E. Lipsky, *Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(10): p. 1230-8.
8. Kohem, C.L., et al., *Enrichment of differentiated CD45RBdim,CD27-memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(5): p. 844-54.

9. Ward, S.G., K. Bacon, and J. Westwick, *Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction*. *Immunity*, 1998. **9**(1): p. 1-11.
10. Suzuki, N., et al., *Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis*. *Int Immunol*, 1999. **11**(4): p. 553-9.
11. Nissinen, R., et al., *CCR3, CCR5, interleukin 4, and interferon-gamma expression on synovial and peripheral T cells and monocytes in patients with rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2003. **30**(9): p. 1928-34.
12. Kawanaka, N., et al., *CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(10): p. 2578-86.
13. Katschke, K.J., Jr., et al., *Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(5): p. 1022-32.
14. Mack, M., et al., *Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(5): p. 981-8.
15. Zapico, I., et al., *CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis*. *Genes Immun*, 2000. **1**(4): p. 288-9.
16. Patel, D.D., J.P. Zachariah, and L.P. Whichard, *CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium*. *Clin Immunol*, 2001. **98**(1): p. 39-45.
17. Garred, P., et al., *CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 1998. **25**(8): p. 1462-5.

18. Gomez-Reino, J.J., et al., *Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(5): p. 989-92.
19. Wedderburn, L.R., et al., *Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(4): p. 765-74.
20. Pokorny, V., et al., *Evidence for negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(3): p. 487-90.
21. Kasama, T., et al., *Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(6): p. 2868-76.
22. Barnes, D.A., et al., *Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(12): p. 2910-9.
23. Yang, Y.F., et al., *A non-peptide CCR5 antagonist inhibits collagen-induced arthritis by modulating T cell migration without affecting anti-collagen T cell responses*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(8): p. 2124-32.
24. Vierboom, M.P., et al., *Inhibition of the development of collagen-induced arthritis in rhesus monkeys by a small molecular weight antagonist of CCR5*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(2): p. 627-36.
25. Szekanecz, Z., J. Kim, and A.E. Koch, *Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis*. *Semin Immunol*, 2003. **15**(1): p. 15-21.

26. Bruhl, H., et al., *Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2420-6.
27. Haringman, J.J., et al., *Chemokine blockade and chronic inflammatory disease: proof of concept in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(8): p. 715-21.
28. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
29. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
30. Proudfoot, A.E., *Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 106-15.
31. John, S., et al., *Genetic variation in CCR5 does not predict clinical outcome in inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(12): p. 3615-6.
32. Christopherson, K., 2nd and R. Hromas, *Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 388-96.
33. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(1): p. 6-15.
34. van der Voort, R., et al., *Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(5): p. 1381-91.

