



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Expressão não equilibrada do receptor de hidrocarboneto arílico nos linfócitos T CCR6+ CD4+ e CD4+ CD25+ do sangue periférico na artrite reumatoide[☆]



Lin Cheng^a, Long Qian^{a,*}, Yue Tan^a, Guo-Sheng Wang^b, Xiao-Mei Li^b, Xiang-Pei Li^b e Chao-Yin Luo^a

^a Anhui Medical University, The Second Affiliated Hospital, Department of Rheumatology and Immunology, Hefei, China

^b Anhui Medical University, Affiliated Anhui Provincial Hospital, Department of Rheumatology and Immunology, Hefei, China

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 24 de agosto de 2015

Aceito em 17 de abril de 2016

On-line em 1 de julho de 2016

Palavras-chave:

Artrite reumatoide

Receptores de hidrocarboneto arílico

Linfócitos T CD4+ CD25+

Linfócitos T CCR6+ CD4+

R E S U M O

Objetivo: Analisar o papel do receptor de hidrocarboneto arílico (AhR) nos linfócitos T CCR6+ CD4+ e CD4+ CD25+ no sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide (AR).

Métodos: Foi aplicada citometria de fluxo para determinar a proporção de células AhR positivas em linfócitos CCR6+ CD4+ e CD4+ CD25+ do sangue periférico e células mononucleares periféricas de cada indivíduo. Os níveis de expressão relativa de ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *ribonucleic acid*, RNAm,) de AhR e RNAm de enzima de primeiro estágio essencial para o AhR (CYP1A1) foram testados por reação em cadeia de polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*, PCR,) em tempo real.

Resultados: A percentagem de células AhR positivas nas células mononucleares do sangue periférico foi maior no grupo com AR do que nos indivíduos saudáveis [(35,23 ± 10,71)% vs. (18,83 ± 7,32)%], ($p < 0,01$). Os níveis de expressão de AhR e CYP1A1 estavam aumentados em pacientes com AR quando comparados com os controles [(3,71 ± 1,63) vs. (2,00 ± 1,27), $p = 0,002$; (2,62 ± 2,08) vs. (0,62 ± 0,29), $p < 0,01$, respectivamente]. Em pacientes com AR, a percentagem de células AhR positivas nos linfócitos T CD4+ CD25+ foi significativamente inferior à dos controles [17,90 (6,10 ± 80,10)]% vs. (52,49 ± 19,18)%, $p < 0,01$; em controles saudáveis, a percentagem de células AhR positivas nos linfócitos T CD4+ CD25+ foi significativamente mais elevada do que nos linfócitos T CCR6+ CD4+ e também foi significativamente maior do que nas células mononucleares do sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC,) [(52,49 ± 19,18)% vs. (23,18 ± 5,62)% vs. (18,06 ± 7,80)%, $X^2 = 24,03$, $p < 0,01$]; em pacientes com AR, a percentagem de células AHR positivas nos linfócitos T CCR6+ CD4+ era significativamente maior em comparação com os linfócitos T CD4+ CD25+

[☆] Estudo feito no Departamento de Reumatologia e Imunologia, The Second Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei, China.

* Autor para correspondência.

E-mail: longqian0551@hotmail.com (L. Qian).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2016.04.003>

0482-5004/© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

e PBMC (46,02 ± 14,68)% vs. [17,90 (6,10 ± 80.10)]% vs. (34,22 ± 10,33)%, $X^2 = 38,29$, $p < 0,01$]; no entanto, não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre os dados clínicos e células AhR positivas em linfócitos T CCR6+ CD4+ e CD4+ CD25+.

Conclusão: O AhR pode participar do progresso patológico da AR ao controlar a diferenciação de linfócitos Th17 e Treg no sangue periférico.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Unbalanced expression of aryl hydrocarbon receptor in peripheral blood CCR6⁺ CD4⁺ and CD4⁺ CD25⁺ T cells of rheumatoid arthritis

A B S T R A C T

Keywords:

Rheumatoid arthritis, Aryl hydrocarbon receptor CD4⁺ CD25⁺ T cells CCR6⁺ CD4⁺ T cells

Objective: The goal of this study was to analyze the role of aryl hydrocarbon receptor in peripheral blood CCR6⁺CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺T cells of patients with rheumatoid arthritis.

Methods: Flow cytometry was applied to determine the proportion of AhR positive cells in CCR6⁺CD4⁺T, CD4⁺CD25⁺T and peripheral blood peripheral mononuclear cells from each subject. AhR mRNA and CYP1A1 mRNA relative expression levels were tested by real-time PCR.

Results: The percentage of AhR positive cells in peripheral blood mononuclear cells was higher in RA group than that in healthy cases [(35.23 ± 10.71)% vs. (18.83 ± 7.32)%, $p < 0.01$]. The expression levels of AhR and CYP1A1 were both increased in patients with RA while compared to controls [(3.71 ± 1.63) vs. (2.00 ± 1.27), $p = 0.002$; (2.62 ± 2.08) vs. (0.62 ± 0.29), $p < 0.01$, respectively]. In RA patients, the percentage of AhR positive cells in CD4⁺CD25⁺T cells was significantly lower than that from controls [17.90 (6.10 ± 80.10)% vs. (52.49 ± 19.18)%, $p < 0.01$]; In healthy controls, the percentage of AhR positive cells in CD4⁺CD25⁺T cells was significantly higher than that in CCR6⁺CD4⁺T cells, and was also significantly higher than that in PBMCs [(52.49 ± 19.18)% vs. (23.18 ± 5.62)% vs. (18.06 ± 7.80)%, $X^2 = 24.03$, $p < 0.01$]; in RA patients, the percentage of AhR positive cells in CCR6⁺CD4⁺T cells was significantly increased than that in CD4⁺CD25⁺T cells and PBMCs [(46.02 ± 14.68)% vs. 17.90 (6.10 ± 80.10)% vs. (34.22 ± 10.33)%, $X^2 = 38.29$, $p < 0.01$]; Nevertheless, no statistically significant relationship was found between clinical data and AhR positive cells in CCR6⁺CD4⁺T and CD4⁺CD25⁺T cells.

Conclusion: AhR may participate in the pathological progress of RA by controlling the differentiation of Th17 and Treg cells in peripheral blood.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica que afeta cerca de 1% da população¹. O receptor de hidrocarboneto arílico (AhR), formado por 806 aminoácidos, é um fator de transcrição que pertence à família bHLH (hélice-volta-hélice básico)-PAS (Per-ARNT-Sim)². O AhR se combina a proteínas chaperonas no citoplasma e mantém uma forma inativa na ausência de seus ligantes, como o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) e o 6-formilindolo [3,2-b] carbazole (FICZ). Uma vez ativado, o AhR se dissocia das proteínas e se transfere para o núcleo para induzir a expressão de genes a jusante (*downstream*).

Os linfócitos T auxiliares (Th) 17 e linfócitos T reguladores (Treg) são grupos da família de linfócitos T CD4+. Os linfócitos Th17 produtores de interleucina (IL) 17 expressam predominantemente o receptor de quimiocina CC (CCR) 6, que é um marcador essencial para os linfócitos Th17 nas doenças autoimunes.³ Um estudo anterior sugeriu que a AR

em modelos animais pode ser melhorada quando tratada com o antianticorpo monoclonal CCR6³, o que pode indicar que a expressão do CCR6 desempenha um papel essencial na doença autoimune. Os linfócitos T CCR6+ CD4+ são o principal componente dos linfócitos Th17,³⁻⁶ enquanto isso, o CCR6 é considerado um biomarcador de linfócitos Th17 humanos.^{5,6} A linhagem CD4+ CD25+ de linfócitos Treg é uma célula imunossupressora que tem uma atuação essencial nas respostas imunes e autoimunes; acredita-se que o fator de transcrição da proteína P3 *forkhead box* (Foxp3) determina a linhagem de linfócitos Treg⁷. Recentemente, estudos descobriram que o AhR era altamente expresso em linfócitos Th17 e Treg,^{8,9} o que poderia ativar suas vias de sinalização, controlar a diferenciação das células e ainda estar envolvido na patogênese de doenças autoimunes, de uma forma específica do ligante.^{8,9,11}

Embora o AhR visto como um participante importante em doenças autoimunes tenha sido estudado e identificado em pesquisas anteriores, o modo exato como se liga à artrite reumatoide em seres humanos é mal compreendido. No presente estudo, investigaram-se os níveis de expressão de RNAm de

AhR e CYP1A1 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e a proporção de células AhR positivas em linfócitos T CCR6+ CD4+ e CD4+ CD25+ para estudar o papel do AhR em linfócitos T CCR6+ CD4+ e CD4+ CD25+ de pacientes com AR.

Pacientes e métodos

Amostra

Foram recrutados do Departamento de Reumatologia do *The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University* 35 pacientes com AR (com média de $49,22 \pm 8,94$ anos, oito homens e 27 mulheres) de acordo com os critérios revisados da *American Rheumatism Association* de 1987.¹² Os critérios de inclusão do estudo foram: (a) diagnóstico definitivo; (b) ausência de outras doenças autoimunes; (c) ausência de doenças infecciosas; (d) tratamento com os mesmos fármacos para pacientes com AR. Além disso, concomitantemente, selecionaram-se aleatoriamente 14 controles saudáveis pareados por idade e sexo a partir do centro de saúde (média de $46,5 \pm 7,5$ anos, três homens e 11 mulheres). Calcularam-se minuciosamente parâmetros clínicos e o escore de atividade da doença em 28 articulações (DAS28). O Comitê de Ética do Hospital aprovou o estudo. Obteve-se o consentimento informado dos pacientes ou de seus parentes se fossem incapazes de fornecer.

Isolamento de células

Armazenaram-se 5 mL de sangue venoso periférico em tubos anticoagulação com ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *Ethylendiamine tetraacetic acid*, EDTA,) como anticoagulante. As PBMC foram separadas com centrifugação por gradiente de densidade (Beijing Solarbio Science and Technology Company, Beijing, China). A quantidade total de PBMC de cada amostra não foi inferior a 1×10^6 .

Citometria de fluxo

Marcadores de superfície celular

Adicionaram-se 5 μ L de CD25-PE e 2 μ L de CD4-PerCP-Cy5.5 a tubos de fluxo marcados (a, b), ao mesmo tempo em que foram adicionados 5 μ L de CCR6-PE e 2 μ L de CD4-PerCP-Cy5.5 a outros dois tubos (c, d). Depois de misturar o líquido dos quatro tubos, eles foram colocados em um refrigerador a 4 °C por 20 minutos. Em seguida, foram preparados 2 mL de tampão para lavá-los uma vez. Os anticorpos mencionados previamente foram adquiridos da Becton, Dickinson and Company (BD), Estados Unidos.

Fixação e perfuração

Misturaram-se 100 μ L de PBMC a 500 μ L de fixadores (Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos) em quatro tubos para incubar evitando a luz a 4 °C de temperatura; depois disso, utilizou-se 1 mL de tampão para lavá-los duas vezes.

Método indireto de marcação do AhR

Adicionaram-se a cada tubo uma mistura de 2 μ L do primeiro anticorpo (o anticorpo antirreceptor de hidrocarboneto arílico, Abcam Company, Inglaterra) e 2 μ L de solução salina

Tabela 1 – Primers usados para a RT-PCR quantitativo em tempo real

Genes	Primer	
AhR	Forward primer	5'- ATACCGAAGACCGAGCTGAAT -3'
	Reverse primer	5'- CCAGCAGACACCTTAGACGAC -3'
β -action	Forward primer	5'- AGCGAGCATCCCCAAAGTT -3'
	Reverse primer	5'- GGGCAGGAAGGCTCATCATT -3'
CYP1A1	Forward primer	5'-CATCCCCACAGCACAACAAGAGA -3'
	Reverse primer	5'-GCAGCAGGATAGCCAGGAAGAGAA -3'

AhR, hidrocarboneto arílico; β -action; CYP1A1, enzima de primeiro estágio essencial para o AhR.

tamponada com fosfato (PBS). Aplicou-se 1 mL de tampão para lavá-los depois de colocar a mistura em temperatura ambiente e evitar-se a luz durante uma hora; em seguida, adicionaram-se 2 μ L do segundo anticorpo (anticorpo monoclonal [2A9] secundário de rato contra IgG de cadeia pesada de coelho [isotiocianato de fluoresceína, FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*], Abcam Company, Inglaterra) a quatro tubos, que foram colocados na câmara à temperatura ambiente e evitou-se a luz por 30 min. Usaram-se 2 μ L de tampão para lavá-los duas vezes e, por fim, adicionaram-se 200 μ L de PBS aos tubos.

Análise de citometria de fluxo

O software CellQuest (FACSAclibur, BD Company) detectou a porcentagem de linfócitos T CD4+ CD25+ e CCR6+ CD4+ nas PBMC e a proporção de células AhR positivas nas PBMC, linfócitos T CCR6+ CD4+ e CD4+ CD25+. Testou-se a quantidade de células de pelo menos 100 mil unidades de cada vez e aplicou-se o FlowJo 7.6.1 para analisar os dados.

Isolamento e transcrição reversa do RNA total

O ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) total das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR foi separado com o reagente Trizol (Invitrogen Califórnia, EUA). Primers foram concebidos e sintetizados pela Takara Biotechnology (Tóquio, Japão). As sequências específicas de primers são mostradas na [tabela 1](#). O kit de reagentes PrimeScript RT (Takara Biotechnology, Japão) foi usado para fazer a síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês *deoxyribonucleic acid*, DNA,) de acordo com as instruções do fabricante.

PCR quantitativo em tempo real

A PCR foi feita em um sistema de reação de 20 μ L com 1,6 μ L de primers (0,8 μ L de *forward primer* e *reverse primer*, respectivamente), 2 μ L de DNAC, 0,4 μ L de corante de referência ROX II, 6 μ L de dH₂O e 10 μ L de SYBR Premix Ex Taq™ II. Todas as amostras foram amplificadas no mesmo local no sistema de reação em cadeia da polimerase em tempo real ABI 7500

(Applied Biosystems, Foster City, CA). Usou-se o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para computar o valor de expressão do AhR e CYP1A1.

Análise laboratorial

Mensuraram-se a velocidade de hemossedimentação (VHS), a proteína C reativa (PCR) e o anticorpo anti-peptídeos cíclicos citrulinados (A-CCP) de todos os pacientes com AR.

Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo programa *Statistical Package for Social Sciences 10.0* (SPSS Inc.; 2000). As variáveis quantitativas foram registradas pela média \pm DP; as diferenças foram analisadas pelo teste t de Student se os dados atendessem à distribuição normal e homogeneidade de variância. No entanto, dados de distribuição não paramétrica foram descritos pela mediana e pelo intervalo interquartil (IIQ). Usou-se a análise de variância (Anova) para comparar os dados nos três grupos e a comparação entre dois grupos dentre os três grupos foi feita com o teste LSD-t ou o teste U de Mann-Whitney. Usou-se a análise de correlação de Spearman neste estudo. Considerou-se um $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Resultados

Percentagens de AhR nas PBMC de pacientes com AR e controles

Como mostrado na [figura 1](#), a percentagem de células AhR positivas era menor em controles saudáveis ($18,83 \pm 7,32$)% do que em pacientes com AR ($35,23 \pm 10,71$)% ($p < 0,01$).

Aumento nos níveis de RNAm do AhR e CYP1A1 nas PBMC de pacientes com AR

Como mostrado na [figura 2](#), os níveis de expressão de RNAm de AhR e CYP1A1 estiveram aumentados em pacientes com AR em comparação com os controles [($3,71 \pm 1,63$) vs. ($2,00 \pm 1,27$), $p = 0,002$; ($2,62 \pm 2,08$) vs. ($0,62 \pm 0,29$), $p < 0,01$, respectivamente].

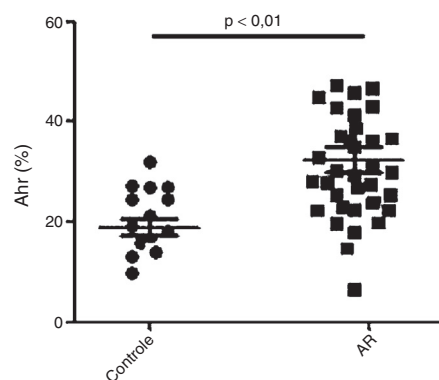


Figura 1 – Percentagem de AhR nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR e controles saudáveis.

Percentagem de AhR em linfócitos T CCR6+ CD4+ e CD4+ CD25+ de pacientes com AR e indivíduos saudáveis

Como mostrado na [figura 3](#), a percentagem de células AhR positivas nos linfócitos T CCR6+ CD4+ era claramente mais elevada em pacientes com AR ($46,02 \pm 14,68$)% do que em indivíduos saudáveis ($23,18 \pm 5,62$)% ($p < 0,01$) ([fig. 3A](#)). Em contraste, a percentagem de células AhR positivas nos linfócitos T CD4+ CD25+ era menor em pacientes com AR [$17,90$ ($6,10, 80,10$)]% do que no grupo de indivíduos saudáveis ($52,49 \pm 19,18$)% ([fig. 3B](#)). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p < 0,01$).

Comparação da percentagem de células AhR positivas nos linfócitos T CD4+ CD25+, linfócitos T CCR6+ CD4+ do sangue periférico e PBMC nos grupos controle e AR

No grupo saudável, a percentagem de células AhR positivas nos linfócitos T CD4+ CD25+ foi significativamente maior do que nos linfócitos T CCR6+ CD4+ e também foi estatisticamente maior do que nas PBMC [($52,49 \pm 19,18$)% vs. ($23,18 \pm 5,62$)% vs. ($18,06 \pm 7,80$)%, $X^2 = 24,03$, $p < 0,01$] ([fig. 4A](#)). Mesmo assim, a percentagem de células AhR positivas nos linfócitos T CCR6+ CD4+ era significativamente maior em relação aos linfócitos T CD4+ CD25+ e também era significativamente

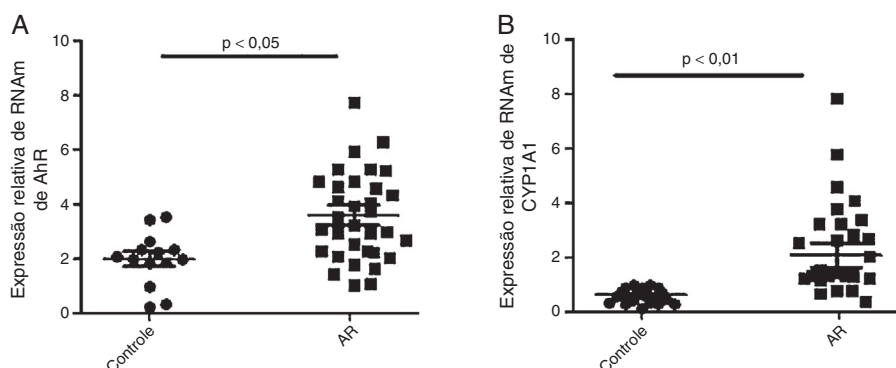


Figura 2 – Níveis de expressão de RNAm de AhR e CYP1A1 em células mononucleares periféricas de pacientes com AR e controles.

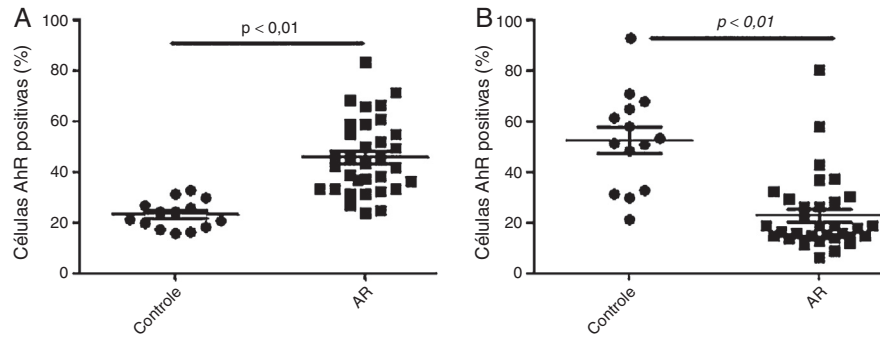


Figura 3 – Percentagens de células AhR positivas em linfócitos T CCR6+ CD4+ (A) e linfócitos T CD4+ CD25+ de controles saudáveis e pacientes com AR (B).

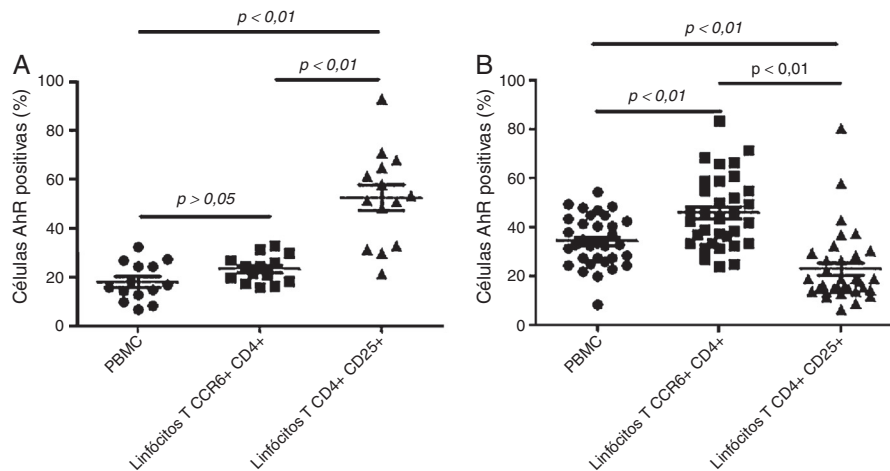


Figura 4 – Percentagens de células AhR positivas em PBMC, linfócitos T CCR6+ CD4+, linfócitos T CD4+ CD25+ dos grupos controle (A) e AR (B).

maior do que nas PBMC ($46,02 \pm 14,68\%$) vs. [$17,90$ (6,10, 80,10%)] vs. ($34,22 \pm 10,33\%$), $X^2 = 38,29$, $p < 0,01$] (fig. 4B).

Correlação entre as células AhR positivas nos linfócitos T CCR6+ CD4+ e linfócitos T CD4+ CD25+ do sangue periférico e parâmetros clínicos principais de pacientes com AR

Fez-se a correlação de Spearman para avaliar a associação entre os níveis de expressão de RNAm de AhR/CYP1A1, células AhR positivas nos linfócitos T CCR6+ CD4+ e linfócitos T CD4+ CD25+ no sangue periférico e parâmetros clínicos principais. No entanto, não foi encontrada correlação significativa entre eles e os detalhes estão resumidos na tabela 2.

Discussão

A AR é uma doença autoimune sistêmica que se manifesta principalmente como uma poliartrite, especialmente das pequenas articulações das mãos e dos pés. Essa poliartrite é caracterizada pela destruição da articulação e incapacidade crônica.¹³ No entanto, os mecanismos das vias imunes na AR ainda não foram identificados. Nos últimos anos, um rico conjunto de dados mostrou que a autotolerância desempenha um

papel dominante na autoimunidade, incluindo na AR, já que a autoimunidade é erroneamente ativada em resposta ao seu autoantígeno. A autotolerância em pacientes com AR pode ser regulada por vários fatores, como as citocinas, os riscos ambientais e os fatores de estilo de vida¹⁴. Atualmente, acredita-se que a homeostase aberrante de linfócitos T atua na patogênese. Além disso, acredita-se que a disfunção de linfócitos Treg e/ou a desregulação de linfócitos Th17 contribua para o desenvolvimento de doenças autoimunes. De modo semelhante, as evidências acumuladas indicam que a AhR desempenha um papel essencial na regulação da diferenciação de linfócitos Th17 e Treg, que afeta o desenvolvimento de diversas doenças autoimunes, incluindo a artrite reumatoide.^{11,15,16,17,18,19,20}

O AhR está localizado no citoplasma e mantém uma forma inativa na ausência dos seus ligantes, como o TCDD e o FICZ. Uma vez ativado, os complexos AhR se combinam à proteína translocador nuclear AhR (Arnt) para serem heterodímeros no núcleo, onde se ligam a sequências de DNA específicas conhecidas como elementos de resposta a xenobiótico (XRE). Essa ligação produzirá alguma reação. Durante esse processo ativado, uma CYP1A1, que é o gene responsivo mais amplamente estudado, tinha uma expressão mais elevada.²¹ Vários grupos demonstraram previamente um estado de AhR altamente expresso em células ubíquas, incluindo os linfócitos Th17, Treg e células dendríticas (CD)^{8,9,22}.

Tabela 2 – Correlação entre as percentagens de células AhR positivas em linfócitos T CCR6+ CD4+/CD4+ CD25+, expressão de RNAm de AhR/CYP1A1 de pacientes com AR e parâmetros clínicos

Parâmetros clínicos		VHS	PCR	A-CCP	Pontuação no DAS28	Curso
RNAm AhR	r	0,115	0,014	0,003	0,068	-0,107
	p	0,511	0,936	0,987	0,698	0,541
RNAm CYP1A1	r	0,007	0,149	-0,035	0,143	0,031
	p	0,967	0,392	0,842	0,411	0,860
Linfócito T CCR6+ CD4+	r	-0,262	-0,273	0,055	-0,187	-0,309
	p	0,14	0,124	0,761	0,296	0,08
Linfócito T CD4+ CD25+	r	-0,129	0,013	0,140	-0,045	-0,081
	p	0,475	0,943	0,436	0,804	0,653

AhR, hidrocarboneto arílico; AR, artrite reumatoide; A-CCP, anticorpo antipeptídeos cíclicos citrulinados; CYP1A1, enzima de primeiro estágio essencial para o AhR; DAS28, escore de atividade da doença em 28 articulações; PCR, reação em cadeia de polimerase; RNAm, ácido ribonucleico mensageiro; VHS, velocidade de hemossedimentação.

Curiosamente, na visão tradicional, o fator essencial da patogênese nas doenças autoimunes é principalmente decorrente do desequilíbrio na relação entre os linfócitos Th1 e Th2. No entanto, pesquisadores mais modernos tiveram uma tendência de se concentrar mais no equilíbrio entre os linfócitos Th17 e Treg pertencentes à família dos linfócitos T CD4+. Quintana *et al.*¹⁷ mostraram que a ativação do AhR pelo seu ligante 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina induz linfócitos Treg funcionais que suprimiram a encefalomielite autoimune experimental (EAE), mas aumentaram a diferenciação de linfócitos Th17 e ainda aumentaram o risco de EAE se o ligante fosse o FICZ em modelos animais. Esse estudo iluminou ainda mais a importância do equilíbrio nos linfócitos Th17 e Treg. Um estudo feito por de Kleer *et al.*²³ mostrou uma quantidade significativamente maior de linfócitos Treg CD4+ CD25+ na artrite idiopática juvenil (AIJ) do que na AIJ oligoarticular estendida (AIJ OA-est); esse estudo sugeriu ainda que quanto maior a frequência de linfócitos Treg CD4+ CD25+ no tecido sinovial de pacientes com AIJ, menor a gravidade da doença. Relatou-se que a deficiência de linfócitos Treg CD4+ CD25+ pode exacerbar os sintomas em pacientes com AR^{24,25}. Entretanto, Nguyen *et al.*²⁶ mostraram que a progressão da doença não pode ser evitada por linfócitos Treg CD4+ CD25+, mas que a gravidade seria reduzida por sua função imunossupressora.

Até o momento, as pesquisas sobre o AhR no sangue periférico, bem como em Th17 e Treg de pacientes com AR, são escassas. Com base nos estudos e nos conceitos mencionados, fez-se o experimento. Consistente com achados prévios,^{8,10,11,17} em primeiro lugar encontrou-se uma frequência estatisticamente maior de células AhR positivas em pacientes com AR quando comparados com controles saudáveis. Além disso, encontrou-se também que o RNAm de AhR e CYP1A1 eram sobre-expressos em pacientes com AR. Perante o resultado, pode-se especular que o AhR foi ativado e desempenhou um papel significativo em pacientes com AR. Em segundo lugar, o presente estudo mostrou não só que a percentagem de AhR em linfócitos T CCR6+ CD4+ era maior, mas também que a percentagem de linfócitos T CD4+ CD25+ era menor em pacientes com AR em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, no presente estudo, encontrou-se uma maior frequência de células AhR positivas nos linfócitos T CD4+ CD25+ do que em linfócitos T CCR6+ CD4+ e PBMC de indivíduos saudáveis; no entanto, a proporção de células

AhR positivas em linfócitos T CCR6+ CD4+ foi maior em PBMC e ambas foram mais elevadas do que nos linfócitos T CD4+ CD25+. Todos estes resultados em conjunto apoiam a ideia de que o AhR desempenha um papel essencial na diferenciação e função dos linfócitos Treg CD4+ CD25+ e Th17 CCR6+ CD4+ e no controle do equilíbrio de linfócitos Th17 e Treg e que pode fornecer mais abordagens terapêuticas na AR. No entanto, não foram encontradas correlações significativas entre os níveis de expressão de RNAm de AhR/CYP1A1, células AhR positivas nos linfócitos T CD4+ CD25+ e nos linfócitos T CCR6+ CD4+ e a PCR, VHS, A-CCP, DAS28 e curso da doença. Isso potencialmente informa que esses poderiam não refletir a atividade da doença ou que o tamanho da amostra é insuficiente.

Em conclusão, os achados do presente estudo primeiramente demonstram uma associação entre o AhR e os linfócitos Treg CD4+ CD25+ e linfócitos Th17 CCR6+ CD4+ no sangue periférico de pacientes com AR, o que pode ampliar nossos horizontes em relação à etiologia da AR e fornecer novos *insights* sobre a patogênese da doença. Os resultados do presente estudo sugerem que o AhR pode desempenhar um papel central no controle do equilíbrio de linfócitos Th17 e Treg por sua expressão desequilibrada no sangue periférico e ainda participar na patogênese da AR. Naturalmente, esses resultados precisam ser elucidados por pesquisas adicionais.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado por todos os doadores que cordialmente forneceram as amostras de sangue.

REFERÊNCIAS

1. Sangha O. Epidemiology of rheumatic disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39 suppl 2:3-12.
2. Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:8185-9.

3. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*. 2007;204:2803-12.
4. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007;8:639-46.
5. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204:1849-61.
6. Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN, Farber JM. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol*. 2008;180:214-21.
7. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, et al. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*. 2007;27:786-800.
8. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, et al. The Aryl hydrocarbon receptor links Th17-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*. 2008;453:106-9.
9. Nakahama T, Kimura A, Nguyen NT, Chinen I, Hanieh H, Nohara K, et al. Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:14222-7.
10. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133:775-87.
11. Singh NP, Singh UP, Singh B, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PLoS One*. 2011;6:e23522.
12. Araea FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31:315-24.
13. Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*. 2005;11 3 Suppl:S39-44.
14. Oliver JE, Silman AJ. Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2006;35:169-74.
15. Nguyen NT, Nakahama T, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor and experimental autoimmune arthritis. *Semin Immunopathol*. 2013;35:637-44.
16. Kobayashi S, Okamoto H, Iwamoto T, Toyama Y, Tomatsu T, Yamanaka H, et al. A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:1317-22.
17. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, et al. Control of T (reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008;453:65-71.
18. Tamaki A, Hayashi H, Nakajima H, Takii T, Katagiri D, Miyazawa K, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon increases mRNA level for interleukin1 beta in human fibroblast-like synoviocyte line via aryl hydrocarbon receptor. *Biol Pharm Bull*. 2004;27:407-10.
19. Lahoti TS, John K, Hughes JM, Kusnadi A, Murray IA, Krishnegowda G, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonism mitigates cytokine-mediated inflammatory signalling in primary human fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:1708-16.
20. Nakahama T, Kimura A, Nguyen NT, Chinen I, Hanieh H, Nohara K, et al. Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:14222-7.
21. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:309-34.
22. Frericks M, Meissner M, Esser C. Microarray analysis of the AHR system:tissue-specific flexibility in and target genes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;220:320-32.
23. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, et al. CD4+ CD25 bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *Immunol*. 2004;172:6435-43.
24. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF alpha therapy. *J Exp Med*. 2004;200:277-85.
25. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF down-modulates the function of human CD4+ CD25hi T-regulatory cells. *Blood*. 2006;108:253-61.
26. Nguyen LT, Jacobs J, Mathis D, Benoist C. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:509-20.