



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LAURA ESTEVES PETERSEN

**ARTRITE REUMATOIDE COMO MODELO DE
IMUNOSSENESCÊNCIA PREMATURA**

Porto Alegre

2013

LAURA ESTEVES PETERSEN

ARTRITE REUMATOIDE COMO MODELO DE IMUNOSSENESCÊNCIA PREMATURA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer

Porto Alegre

2013

DEDICATÓRIA

A minha mãe e minha madrinha pelo constante apoio, carinho e estímulo que me ofereceram, dedico esta conquista como gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Maria Isabel Esteves Petersen e minha irmã Marcela Esteves Petersen pelo carinho, dedicação, apoio e estímulo diário durante toda minha vida escolar, acadêmica e ao longo dessa trajetória de dois anos. Sem este apoio, possivelmente, esta caminhada teria sido mais difícil para mim.

Gostaria de fazer um agradecimento muito especial a minha madrinha Sílvia Regina Ferraz Petersen, que foi e continua sendo a minha principal motivadora e incentivadora durante minha escolha e qualificação profissional. Agradeço aos meus familiares e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu pai Julio Cesar Canhada Petersen pelo carinho, dedicação e auxílio na busca por participantes nessa pesquisa.

Agradeço ao Rafael Pittas, pela paciência, compreensão e carinho durante essa trajetória. Obrigada pelo apoio que foi de extrema importância para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer ao professor Moisés Evandro Bauer por ter me recebido com toda a dedicação para compor seu grupo de orientandos. Além disto, agradeço por todo o conhecimento que adquiri durante esses dois anos que se passaram. Agradeço pela confiança em mim e no meu trabalho.

As minhas até então colegas, e agora amigas Talita Siara, Suyam Gehlm e Mariana Ilha que foram de extrema importância para o sucesso desta pesquisa. Muito obrigada pela força, ajuda, companheirismo durante toda esta trajetória. Com toda a certeza minha busca por pacientes e controles se tornaram muito mais agradáveis na companhia destas meninas.

Agradeço também Carine Hartmann do Prado, Andréia Wieck e Lucas Rizzo, por me ensinarem a usar software e equipamentos essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Além disso, registro os meus mais sinceros agradecimentos aos três citados acima, Ágatha Schommer, Carina Zuppa, Julia Motta, Bruna Luz, Guilherme Muller e Ana Paula Ornaghi pela companhia e parceria diária no laboratório de imunologia do envelhecimento.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – drogas anti-inflamatórias não esteroidais

AR – artrite reumatoide

DAS – score da atividade da doença

DMARDs – drogas anti-reumáticas moduladoras da doença

FCS – fluido cérebro-espinhal

FR – fator reumatoide

GC – glicocorticoides

GR – receptor de glicocorticoides

HLA – complexo de histocompatibilidade humano

Ig - imunoglobulina

IL – interleucina

MMSE – mini-exame do estado mental

NK – células natural *killer*

PBMCs – células mononucleares do sangue periférico

PCR – proteína C reativa

SNC – sistema nervoso central

TCR – receptor de célula T

TGF – fator de crescimento de transformação

Th – células T *helper*

TNF – fator de necrose tumoral

TRECs – alças de ciclos de excisão de células T

Treg – células T regulatórias

TSE – taxa de sedimentação eritrocitária

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará a seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, que além da presença de danos físicos, tem sido associada com o envelhecimento prematuro do sistema imune (imunossenescência) e morbidades relacionadas à idade, incluindo declínio no funcionamento cognitivo. Fatores como a inflamação crônica e o uso de glicocorticoides (GCs), ambos relacionados a AR, são potenciais mecanismos envolvidos com a disfunção cognitiva na população geral. Estudos experimentais tem revelado a contribuição benéfica das células imunológicas sobre o sistema nervoso central (SNC). Além disto, patologias como o dano cognitivo leve e doença de Alzheimer apresentam alterações nos subtipos linfocitários periféricos. Com base nisto, neste trabalho nos exploramos as relações entre função cognitiva, score de atividade da doença (DAS-28), e subtipos linfocitários na AR. Trinta pacientes com AR e dezenove controles saudáveis, que não diferiram significativamente em relação a sexo, idade e escolaridade, foram recrutados neste estudo. A função cognitiva (mini-exame do estado mental - MMSE, memória lógica e memória de trabalho), estresse e depressão foram avaliados através de entrevistas onde foram aplicados questionários clínicos específicos. Os linfócitos foram isolados das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), e imunofenotipados por citometria de fluxo para investigar a presença dos seguintes subgrupos: células B, células T ativadas, células T *naive*/memória, células T regulatória (reg) CD4+FoxP3+, células IL-17+, células natural *killer* (NK), e células T CD28- associadas a senescência. Os pacientes com AR tiveram um desempenho cognitivo inferior no MMSE, memória lógica e memória de trabalho se comparado a controles saudáveis. Embora todos os indivíduos, de ambos os grupos, tiveram uma pontuação superior à estabelecida pelo *cutoff* do MMSE. O tempo de uso de GCs e os níveis de proteína C - reativa (PCR) não se correlacionaram com avaliação cognitiva. Os pacientes tem aumento nas proporções de células Treg, células T CD4+ *naive* e células T associadas a senescência (CD28), mas baixas porcentagens de células B e células T CD8+ de memória do que controles saudáveis. Células T recém ativadas e células T CD8+CD28- foram negativamente associadas com a cognição. Concluindo, pacientes com AR tem um desempenho cognitivo inferior se comparado a controles saudáveis. GCs e PCR não se correlacionaram com memória, no entanto, expansão

da população de células T ativadas e células T associadas à senescência foram correlacionadas com performance de memória.

Palavras chave: Artrite reumatoide, glicocorticoides, prejuízo cognitivo, inflamação, células T, linfócitos.

ABSTRACT

The rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease, besides the physical damage, the RA has been associated with premature aging of the immune system (immunosenescence) and age-related morbidities, including a decline in cognitive functioning. Factors such as chronic inflammation and the use of glucocorticoids (GCs) for a long time, both related to RA, are potential mechanisms involved in cognitive dysfunction in the general population. Experimental studies have shown the beneficial contribution of immune cells on the central nervous system (CNS). Moreover, disorders, such as mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, exhibit alterations in peripheral lymphocytes subtypes. Based on this, here we explore the relationship between cognitive function, disease activity score (DAS-28) and lymphocytes subsets in RA. Thirty patients with RA and 19 healthy controls, which did not differ significantly in sex, age and schooling were recruited in this study. Cognitive function (MMSE, logic and working memory), stress and depression were assessment through interviews where specific clinical questionnaires were applied. Lymphocytes were isolated from mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) and immuphenotyped by flow cytometry to investigate the following lymphocytes subsets: B cells, activated T cells, naïve/memory T cells, regulatory FoxP3+ T cells, IL-17+ cells, natural killer (NK) cells, and senescence-associated CD28- T cells. RA patients had a lower cognitive performance on the MMSE, logical and working memory compared to healthy controls. Though, all individuals in both groups had a score higher than the cutoff point established by the MMSE. The time use of GC and the C-reactive protein (CRP) levels did not correlated with cognitive assessment. Patients had an increased proportions of regulatory T cells, naïve CD4+ T cells and senesce-associated T cells (CD28-), but lowered percentages of B and memory CD8+ T cells compared to healthy controls. Early activated T cells (CD3+CD69+) and CD8+CD28- T cells were found negatively associated with cognition. Concluding, patients with RA have a lower cognitive performance compared to healthy controls. GC and CRP were not correlated with memory; however expansions of activated and senescence-associated T cells were correlated with poor memory performance.

Keywords: rheumatoid arthritis, glucocorticoids, cognitive impairment, inflammation, T cells, lymphocytes

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.2.1 Patogênese da artrite reumatoide	2
1.2.2 Células T helper 1, T helper 17 e T regulatórias na imunopatogênese da artrite reumatoide	2
1.2.3 Artrite reumatoide como modelo de imunossenescência prematura	4
1.2.4 Tratamento da artrite reumatoide	6
Prejuízo cognitivo em pacientes com artrite reumatoide	8
OBJETIVOS	11
JUSTIFICATIVA.....	12
2. CAPÍTULO 2.....	13
2.1. ARTIGO CIENTÍFICO	14
Abstract	15
Introduction.....	16
<i>SUBJECTS</i>	17
<i>ASSESSMENT OF COGNITIVE FUNCTION AND STRESS LEVELS</i>	17
<i>COLLECTION OF PERIPHERAL BLOOD AND ISOLATION OF MONONUCLEAR CELLS</i>	18
<i>IMMUNOPHENOTYPING</i>	18
<i>STATISTICAL ANALYSIS</i>	19
Results.....	19
<i>DEMOGRAPHIC DATA AND CLINICAL CHARACTERISTICS</i>	19
<i>COGNITIVE FUNCTION AND PSYCHOLOGICAL DISTRESS</i>	20
<i>IMMUNOPHENOTYPING</i>	20
<i>CLINICAL CORRELATES OF COGNITION AND LYMPHOCYTE SUBSETS</i>	20
<i>RELATIONSHIPS BETWEEN COGNITION AND LYMPHOCYTE SUBSETS</i>	21
Discussion	22
Acknowledgments.....	25
Conflict of interest	25
References.....	26
3. CAPÍTULO 3.....	36
3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
4. REFERÊNCIAS	40

1. CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.2.1 Patogênese da artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, progressiva e potencialmente destrutiva. É principalmente definida por características clínicas, notavelmente inflamação crônica. Apresenta efeitos articulares, extra-articulares e sistêmicos (1-4). Do ponto de vista epidemiológico, a prevalência mundial da AR é aproximadamente 0,5 a 1% enquanto que na população brasileira é em torno de 0,46% (5, 6).

As causas da ocorrência da AR não são totalmente esclarecidas, mas acredita-se que fatores genéticos, ambientais e imunológicos possam desencadear o surgimento da doença (7-9). Estudos anteriores mostraram que a AR é proximamente associada com alelos do complexo maior de histocompatibilidade humano (HLA), comumente referido como epítipo compartilhado (10). Dentre as contribuições imunológicas, destaca-se a presença do fator reumatoide (FR). O FR é um anticorpo produzido pelas células B do sistema imunológico que reage contra a porção Fc da imunoglobulina (Ig) G.(8, 11). Como já mencionado anteriormente, a AR é uma doença autoimune parcialmente caracterizada pela presença do FR. No entanto, este por sua vez, não ocorre em todos os casos em que se desenvolve a doença, podendo também ser observado em outras patologias (4, 12).

Com o passar do tempo e se não for propriamente tratada, a AR progressivamente leva a destruição articular e desabilidade funcional. Caracterizada pela inflamação sinovial, as células T, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos e mastócitos penetram na articulação ocasionando uma hiperplasia, comumente chamada de *pannus* (1, 2, 13). A porção da membrana sinovial rica em osteoclastos destrói a estrutura óssea, enquanto que as enzimas secretadas pelos neutrófilos, sinoviócitos e condrócitos degradam a cartilagem (1).

1.2.2 Células T helper 1, T helper 17 e T regulatórias na imunopatogênese da artrite reumatoide

As células T são os principais mediadores do desenvolvimento da AR. As células T podem interagir com outros tipos celulares perpetuando a inflamação com consequente destruição da articulação (12). Historicamente a AR é considerada uma doença com perfil exacerbado de resposta imunológica do tipo T helper 1 (Th1). No entanto, a AR é baseada em um desequilíbrio entre as células Th1/Th2 - portanto, um desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias (14).

É bem estabelecido que as citocinas pró-inflamatórias, especialmente o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a Interleucina (IL) -6, estão envolvidos na patogênese da AR (1, 15). O TNF- α é considerado o desencadeador de eventos pró-inflamatórios devido a sua capacidade de induzir a produção de outras citocinas como, por exemplo, a IL-1 β , IL-6 e IL-8, frequentemente encontradas nas articulações de pacientes com AR (16). Além da capacidade de induzir a produção de citocinas, o TNF favorece a liberação de metaloproteínases de matriz, que promovem a destruição tecidual, induz a expressão de moléculas de adesão sobre as células endoteliais, promovendo a infiltração de células inflamatórias para dentro da sinóvia, auxilia a angiogênese e hiperplasia sinovial, contribuindo para a manutenção e formação do *pannus*, e induz a ativação de células T, resultando na perpetuação de respostas autoimunes (15).

Estudos recentes têm sugerido que as células Th17, produtoras de IL-17, são um novo subgrupo de células críticas para a patogênese da AR (17, 18). A diferenciação em Th17 é dirigida principalmente pela ação do fator β de Crescimento de Transformação (TGF- β). Em sua ausência, as células alteram o perfil para Th1 (17, 19). Segundo ZIZZO et al.(20) as porcentagens de células Th17 do fluido sinovial diretamente correlacionam-se com marcadores inflamatórios articulares (contagem de linfócitos totais e porcentagem de neutrófilos do fluido sinovial) e marcadores inflamatórios sistêmicos (fibrinogênio, proteína C - reativa e taxa de sedimentação eritrocitária). A IL-17 induz a produção de citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , é detectada no tecido e no fluido sinovial de pacientes com AR onde apresenta um papel patogênico por causa de sua associação com a destruição óssea. (18, 21, 22). Um estudo realizado por NAKANO et. al. (17) verificou que a utilização de um anticorpo monoclonal contra o receptor de IL-6 promove uma redução na síntese de IL-17, confirmando a íntima relação entre estas duas citocinas. A IL-17 compartilha muitas propriedades biológicas com o TNF- α e

IL-1 β . A interação dessas citocinas sustenta o processo inflamatório dentro da articulação e amplificam o envolvimento das células T na patogênese da AR (19, 22).

O desenvolvimento de doenças autoimunes requer um desequilíbrio na tolerância imunológica que frequentemente controla a discriminação do próprio e do não próprio (23). Dois maiores subgrupos de células T regulatórias (Treg) podem ser distinguidos: células Treg naturais, que se originam no timo, e células Treg induzidas, conhecidas como Tr1 ou Th3, que se originam a partir de células precursoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ (24). O Foxp3 é um fator de transcrição especificamente expresso em células Treg sendo crucial para a manutenção da função supressora de células Treg periféricas maduras (3). Estas células suprimem respostas de células T CD4⁺ e CD8⁺ através do contato célula-célula, apresentando um papel fundamental na manutenção da tolerância periférica (19). A diminuição da expressão de Foxp3 fortalece respostas autoimunes por subverter a função supressora das células Treg convertendo-as em células T efectoras (25). Segundo HAN et al.(3) pacientes com AR apresentam menos células CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ no sangue periférico do que indivíduos saudáveis. No entanto, indivíduos com AR expressam mais Foxp3⁺ por célula do que indivíduos saudáveis. Embora as células Treg estejam presentes na artrite reumatoide, há indícios de que sua função esteja prejudicada devido à presença de citocinas como, por exemplo, o TNF- α (26).

1.2.3 Artrite reumatoide como modelo de imunossenescência prematura

O envelhecimento é caracterizado por um prejuízo gradual de funcionamento do sistema imune conhecido como imunossenescência (15). O processo de imunossenescência é evidenciado, exteriormente, pelo aumento da ocorrência de infecções, falhas nas respostas a vacinações e reativações virais crônicas (27, 28). A redução da eficácia imunológica se evidencia a partir da sexta década de vida e afeta todos os aspectos do sistema imune, especialmente a imunidade adaptativa (29, 30). No entanto, a AR apresenta altas taxas de incidência na idade adulta, atingindo o pico máximo entre 75 e 85 anos de idade (29). No tema que nos interessa, observa-se que pacientes com AR são imunocomprometidos e evidências

sugerem que o envelhecimento prematuro do sistema imune contribua para a patogênese da doença.

O processo de envelhecimento do sistema imunológico é caracterizado por atrofia do timo, alterações fenotípicas celulares e modificações nos subgrupos de células T (31). A timopoiese é a principal, se não a única, força de geração de novas células T *naive*. A função tímica é estritamente dependente da idade e a involução tímica inicia-se no primeiro ano de vida, é acelerada na adolescência e por volta dos 45 anos, sua atividade já é severamente limitada (27, 32). Como consequência, a quantidade de células T *naive* decai com a idade, sendo um fenômeno mais pronunciado nas células CD8+ do que nas células CD4+ (27). Uma estimativa da atividade tímica pode ser observada através da frequência de células T *naive* que expressam alças de ciclos de excisão de células T (TRECs) (29). Os TRECs são subprodutos do rearranjo do receptor de células T (TCR) que não são duplicados durante a divisão celular, servindo como um marcador de células recém-migradas do timo (30). Um estudo realizado por THEWISSEN et al. (33), comparando pessoas saudáveis, pacientes com AR e indivíduos com esclerose múltipla, mostrou uma redução na quantidade de células TREC+ em pacientes com AR e em indivíduos com esclerose múltipla. Estes dados indicam que em ambas as doenças os sujeitos apresentam uma involução tímica prematura que não condiz com a idade cronológica.

A falha na produção de novas células T favorece um mecanismo de autoproliferação celular na periferia (33). O estresse replicativo, associado à proliferação homeostática para manter o compartimento de células T na ausência da produção tímica, contribui para a senescência celular. A senescência celular, tanto no envelhecimento natural quanto no envelhecimento precoce do sistema imune, é fundamentada em três características: (a) trocas funcionais e fenotípicas, (b) encurtamento dos telômeros e (c) produção de grandes quantidades de citocinas (30, 34). Uma das características mais marcantes de trocas fenotípicas é a perda da expressão da molécula co-estimulatória CD28. O CD28 é expresso sobre a superfície de células CD4+ e CD8+ (35). Tem sido observado que indivíduos com AR têm mais células T CD4+CD28- que os indivíduos saudáveis (33). Embora a função da molécula CD28 seja garantir a ativação apropriada das células T, células T CD4+CD28- retêm a habilidade de produzir citocinas (15). Na deficiência da

principal molécula co-estimulatória, as células ganham capacidades pró-inflamatórias, função citotóxica além se tornarem resistentes a apoptose (33).

Um dos mais notáveis marcadores de envelhecimento celular é o encurtamento dos telômeros. Telômeros são sequencias repetidas de nucleotídeos localizadas na porção terminal dos cromossomos. Apresentam função crítica para a manutenção da integridade do genoma (29). No entanto, servem como marcadores da divisão celular, e ultimamente, senescência celular (15). A extensão dos telômeros é vista como um relógio mitótico porque em cada ciclo de divisão celular eles erodem progressivamente até que a célula entre em estado de senescência onde sofrerá apoptose (15). O encurtamento dos telômeros é um reflexo de um aumento na história replicativa de linfócitos ou de seus precursores podendo também ser causado por um defeito na expressão e função da telomerase (27). A telomerase é uma enzima que atenua o atrito e a erosão dos telômeros e por tanto, na sua ausência as sequências teloméricas são incompletamente duplicadas (27). Em indivíduos saudáveis, os telômeros de células T CD4+ e CD8+ progressivamente erodem até os 65 anos de idade. Em contrapartida, em pacientes com AR o processo é claramente acelerado e independentemente da idade (29). Além disto, a erosão telomérica esta associada, via estresse oxidativo, com a exposição ao tabaco e também com o epítipo compartilhado do gene HLA, que são os principais fatores de risco ambiental e genético, respectivamente, do desenvolvimento da AR (29).

1.2.4 Tratamento da artrite reumatoide

Em poucos anos o tratamento da AR tem sofrido diversas trocas, devido a agressividade da doença e o aumento na quantidade de novos agentes terapêuticos (36). Os fármacos utilizados se distinguem em quatro categorias: drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), drogas anti-inflamatórias esteroidais, drogas anti-reumáticas moduladoras da doença (DMARDs) e agentes biológicos (37).

Os AINEs na AR amenizam os sintomas da doença, reduzindo a inflamação sinovial (38). Os AINEs tem perdido seu papel histórico como primeira linha de

tratamento devido a sua limitada efetividade, inabilidade de modificar o curso da doença a longo prazo além de seus efeitos gastrintestinais e cardíacos (37).

As DMARDs são fármacos utilizados desde 1980 e acredita-se que sejam um grupo heterogêneo de agentes farmacológicos que tenham uma propriedade anti-reumática (36). Estes medicamentos reduzem o inchaço e a dor articular, limitam o progressivo dano articular e melhoram a função (37). Eles são considerados a terapia farmacológica de primeira linha para o tratamento de AR (39). Dentre os componentes deste grupo, destaca-se o metotrexato que é amplamente e mundialmente utilizado na terapia da AR. O metotrexato é um dos primeiros agentes terapêuticos que teve seu efeito protetor da articulação documentado (36). Apesar de o metotrexato apresentar uma linha de proteção específica na AR, muitos indivíduos respondem insuficientemente ou não respondem ao metotrexato como uma monoterapia, sendo necessário a combinação de agentes, onde o fármaco de escolha é um outro medicamento do grupo DMARDs ou algum medicamento da classe dos agentes biológicos (40).

Os agentes biológicos são uma classe de medicamentos que tem aberto novos horizontes terapêuticos no tratamento da AR. Dentre os imunobiológicos, destaca-se os agentes anti-TNF. A descoberta desta nova terapia partiu de um estudo sobre a função desta citocina pro-inflamatória na articulação de pacientes com AR, e verificou-se que, através da sua supressão, este, por sua vez, era capaz de regular outros mediadores inflamatórios (16). Com base nisso, surgiu a hipótese de que a utilização de um antagonista de TNF seria um alvo interessante para o tratamento da AR (36). A utilização da terapia anti-TNF, em doses apropriadas, reduz tanto a inflamação quanto o dano da articulação (16).

Os glicocorticoides são os representantes dos fármacos anti-inflamatórios esteroidais que foram introduzidos no tratamento da AR há mais de 60 anos atrás (41). Os glicocorticoides tem sido comumente usados como potentes drogas anti-inflamatórias para o tratamento da AR, asma, lúpus eritematoso sistêmico, leucemias e linfomas (42). Aproximadamente um terço dos pacientes com AR são usuários atuais e dois terços dos pacientes nunca usaram esteroides (41). Os sintomas dos pacientes com AR melhoram consideravelmente dentro de poucos dias (43). No entanto, existem evidências em relação à segurança de sua utilização. O uso de glicocorticoides por muito tempo possui vários efeitos adversos que

incluem: resistência à insulina, diabetes, doenças cardiovasculares, cataratas, imunossupressão, depressão maior e prejuízo cognitivo (37, 43).

Prejuízo cognitivo em pacientes com artrite reumatoide

O prejuízo cognitivo e a demência são condições de desabilidade mental que aumentam comumente com o avanço da idade (44). Além do envelhecimento natural, o uso de glicocorticoides e a presença de marcadores inflamatórios, ambos vistos na AR, também são contribuintes para o déficit cognitivo.

Os fatores que tem sido relacionado a um declínio cognitivo na população geral são: inflamação sistêmica, doenças cardiovasculares e uso de glicocorticoides, ambos de particular relevância para a AR (45, 46). Para pessoas com AR, o funcionamento cognitivo é essencial para a realização de atividades diárias e para a aderência ao tratamento (47). O estudo conduzido por MELO *et al.* (48) investigou a presença de distúrbios cognitivos associados a presença de AR, entre outras doenças. Neste estudo, pacientes com AR apresentaram um desempenho reduzido nos testes que avaliam as esferas cognitivas referentes à apraxia visual-construtiva, possivelmente relacionada ao comprometimento físico, motor e cognitivo da doença. SHIN *et al.* (45) explorou a prevalência de déficit cognitivo e os fatores associados com prejuízo cognitivo em 115 pacientes com AR. No entanto, o estudo em questão revelou que um terço dos pacientes selecionados para o estudo apresentou declínio cognitivo, e que as características clínicas (por exemplo, duração da doença e severidade) não foram associadas com redução do desempenho cognitivo. Em contrapartida, fatores relacionados ao tratamento (por exemplo, uso de glicocorticoides), e consequências significantes do curso da doença (risco de doença cardiovascular) foram associados com prejuízo cognitivo nesta população.

No entanto, declínios cognitivos também ocorrem com o avanço da idade (49). Um estudo com Suecos OCTO e NONAGENÁRIOS mostrou que indivíduos com prejuízo cognitivo e fenótipo de risco imunológico (caracterizado por uma relação CD4/CD8 menor do que um), têm um elevado risco de mortalidade se comparado com indivíduos cognitivamente intactos com ou sem fenótipo de risco imunológico, evidenciando a possível relação entre cognição e sistema imunológico (50). A neurogênese, processo de formação de novos neurônios, ocorre durante

toda vida adulta e é pré-requisito para certos aspectos da cognição (51). Focando sobre o papel das células T no auxílio para a manutenção da integridade do sistema nervoso central, ZIV *et al.* (51), utilizando um modelo experimental com ratos, demonstrou uma associação entre células T, atividade microglial e neurogênese hipocampal. Neste estudo foi observado que as células T são importantes para a plasticidade cerebral, sugerindo que as células T afetam a neurogênese adulta. Além disso, o processo de envelhecimento natural e a exposição crônica aos glicocorticoides são associados a uma inflamação residual persistente (*inflammaging*) (28). De fato, marcadores inflamatórios e a exposição crônica aos glicocorticoides têm sido amplamente relacionados a prejuízos cognitivos (44, 52-55). A terapia prolongada com glicocorticoides, amplamente usada na prática clínica, é conhecida por induzir déficit cognitivo (46). O hipocampo, uma região cerebral que processa o aprendizado e a memória de curta duração, pode ser um alvo para lesões biológicas e injúrias teciduais relacionadas ao envelhecimento (56). Grandes quantidades de receptores de glicocorticoides (GRs) são encontradas nesta área. (57). Evidências suportam que os glicocorticoides não tem um efeito específico em nenhuma função cognitiva particular, mas eles podem ser relacionados a um declínio cognitivo geral, contribuindo para déficits de memória (46, 57). Além da exposição aos glicocorticoides, a inflamação pode ser um importante contribuinte para o declínio cognitivo. Estudos tem focado sobre os marcadores inflamatórios e desempenho cognitivo (53, 58). Entre os diversos marcadores pró-inflamatórios, os dois mais frequentemente estudados são a PCR e a IL-6 (59). No entanto, um estudo conduzido por GIMENO *et al.* (59) evidenciou que a inflamação sistêmica de baixo grau é associada com uma reduzida performance cognitiva em domínios específicos, sendo eles raciocínio indutivo e vocabulário. O aumento de proteína C reativa de alta sensibilidade no soro tem sido associado a um aumento do risco de demência e doença de Alzheimer. No entanto, um estudo de acompanhamento evidenciou que altas concentrações de PCR prediz 12 anos antes o surgimento de prejuízo de memória (54). Com base nisto, elevados níveis PCR podem ser usados como biomarcadores para identificar indivíduos com uma maior probabilidade de apresentar prejuízo de memória e eventualmente demência. Além disso, a PCR tem sido associada com prejuízos de aprendizado e memória, sugerindo que esta por sua vez é um possível desencadeador de demência relacionada a doença de

Alzheimer (60). Um estudo recente demonstrou a associação da PCR com a produção da proteína β -amilóide, sendo que a β -amilóide é um componente chave na formação de placas senis que patologicamente caracterizam a doença. No entanto, a PCR tem sido encontrada ao redor de proteínas β -amilóide em lesões cerebrais de pacientes com doença de Alzheimer, onde o prejuízo cognitivo e demência são características bem estabelecidas (58). Além disso, PHILLIPS *et al.* (61), utilizando a taxa de sedimentação eritrocitária (TSE) como marcador da inflamação, mostrou que a habilidade cognitiva é inversamente proporcional a TSE, por exemplo, menor habilidade cognitiva, maior a TSE. Estes dados suportam que a inflamação é um potencial contribuinte para prejuízos cognitivos.

Neste trabalho, investigamos o estado cognitivo funcional e os níveis de estresse de pacientes com AR e controles saudáveis. Além disso, exploramos as relações entre a função cognitiva, gravidade da doença (DAS-28) e subpopulações de linfócitos periféricos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Correlacionar marcadores imunológicos com desempenho cognitivo em pacientes com artrite reumatoide

Objetivos específicos

- Identificar o déficit cognitivo;
- Identificar subtipos linfocitários associados com a imunossenescência;
- Relacionar o déficit cognitivo com tempo de terapia com glicocorticoides;
- Relacionar o déficit cognitivo com marcadores de imunossenescência;
- Relacionar déficit cognitivo com marcadores inflamatórios.

JUSTIFICATIVA

A artrite reumatoide é uma doença autoimune associada com o envelhecimento, apresenta um perfil inflamatório crônico que provoca danos físicos e progressivamente incapacitantes. Devido a seu curso crônico, leva a prejuízos econômicos significativos para o sistema único de saúde. Por outro lado, a capacidade cognitiva dos indivíduos é indispensável para a qualidade de vida dos idosos na medida em que se observa um rápido aumento na expectativa de vida brasileira.

Estas constatações justificam o desenvolvimento e pesquisas que contribuam para melhor conhecer esta doença, particularmente, a relação entre funções cognitivas, marcadores de imunossenescência e tempo de exposição aos glicocorticoides em pacientes com artrite reumatoide.

2. CAPITULO 2

2.1. ARTIGO CIENTÍFICO

A ser submetido para o *Journal of Clinical Immunology*

IMMUNOLOGICAL CORRELATES OF COGNITIVE DYSFUNCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Laura Esteves Petersen ^a, Rodrigo Grassi-Oliveira ^b, Talita Siara ^a, Suyan Gehlm ^a,
Mariana Ilha ^a, Tatiana de Nardi ^b, Mauro Keisermann ^c and Moisés Evandro Bauer ^{a,b,d}

^a Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research, Pontifical Catholic University of the Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;

^b Center of Studies and Research in Traumatic Stress (NEPTE), Faculty of Psychology, PUCRS, Porto Alegre, Brazil;

^c Division of Rheumatology, São Lucas Hospital, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

^d Faculty of Biosciences, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Correspondent author: Moisés Evandro Bauer, PhD. Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas da PUCRS, Av. Ipiranga 6690, 2º andar. P.O. Box 1429. Porto Alegre, RS 90.610-000, Brasil. E-mail: mebauer@pucrs.br

Abstract

Purpose: Rheumatoid arthritis (RA) has been associated with premature aging of the immune system and age-related morbidities, including poor cognitive function. The underlying mechanisms of cognitive impairment in RA are poorly understood. Here, we explored the relationships between cognitive function, disease activity and lymphocyte subsets in RA.

Methods: Thirty patients with RA and 19 age-matched healthy controls took part in this study. Cognitive function (MMSE, logical and working memories), stress and depression scores were evaluated by structured clinical questionnaires. Lymphocytes were immunophenotyped by flow cytometry to investigate the following lymphocyte subsets: B cells, activated T cells, naïve/memory T cells, regulatory FoxP3⁺ T cells, IL-17⁺ cells, NK cells and senescence-associated CD28⁻ T cells. **Results:** Patients with RA were cognitively impaired compared to controls, as shown by reduced MMSE, logical memory and working memory scores. The duration of GC use and C-reactive protein levels did not correlate with cognitive assessments. Patients had increased proportions of regulatory T cells, naïve CD4⁺ T cells and senescence-associated T cells (CD28⁻) but lowered percentages of B and memory CD8⁺ T cells compared to controls. Early activated T cells (CD3⁺CD69) and CD8⁺CD28⁻ T cells were found negatively associated with cognition. **Conclusions:** RA patients had poor cognitive performance as compared to healthy controls. GC and CRP were not correlated with memory; however expansions of activated and senescence-associated T cells were correlated with poor memory performance.

Keywords: Rheumatoid arthritis, glucocorticoids, cognitive impairment, inflammation, T cells

Introduction

Aging is a strong risk factor for developing RA, and the majority of women are diagnosed after the menopause. RA has been associated with premature aging of the immune system and age-related co-morbidities, including poor cognitive function (1-4). The prevalence rates of cognitive impairment in RA ranged from 30% to 70% (5, 6). However, the underlying mechanisms of cognitive impairment in RA are poorly understood. Recent studies have indicated key roles for peripheral lymphocytes in healthy brain functions, including psychological stress responses (7), spatial learning and memory (8, 9), as well as adult neurogenesis in rodents (10). The autoreactive CD4⁺ T cells were especially involved in cognitive processes and animals deficient in T cells were found cognitively impaired (10).

Individuals with RA are immunocompromised and recent evidence suggests that premature aging of the immune system (immunosenescence) contributes to the pathogenesis of disease (11). Important features of accelerated immunosenescence in RA are thymic involution, increased clonal population of T cells in the periphery, decline in the telomere lengths and loss of CD28 co-stimulatory receptor (12). The decline in the generation of new T cells by the thymus has been associated with increased compensatory proliferation in the periphery. As a result, the telomeres of circulating T cells exhibit accelerated erosion (13). The expansion of late differentiated CD28⁻ T cells, a hallmark of immunosenescence, was found more pronounced in CD8⁺ than CD4⁺ T cells (14). Clones of these CD28⁻ T cells from patients with RA are consistently autoreactive (14). It remains to be established to what extent peripheral lymphocytes are involved with cognitive dysfunction in RA.

Here, we investigated functional cognitive functions and stress levels of patients with RA and age-matched healthy controls. In addition, we explored the relationships between cognitive function, disease activity and peripheral lymphocyte subsets.

Materials and methods

Subjects

Thirty-five patients with RA were recruited from the Rheumatology Unit at São Lucas Hospital, PUCRS (Porto Alegre, Brazil). The diagnosis of RA was made according to the criteria of the American College of Rheumatology (15). Five patients were excluded from the study because they met at least one of the exclusion criteria. Thirty RA patients (50.6 ± 13.45 yrs) took part in this study. In addition, 19 age-, sex-, and schooling-matched healthy controls (49.37 ± 15.23 yrs, 4 men and 15 women) also took part in this study. The exclusion criteria included: a) infections, b) under nourishment, c) anemia, d) neoplasias, e) HIV and f) HCV. The study protocol was approved by both scientific and ethics committees of PUCRS (Porto Alegre, Brazil) and written informed consent was obtained from all participants.

Assessment of cognitive function and stress levels

Exclusion of dementia was determined by the Mini-Mental State Examination (MMSE) (16), N-Back task (17) and logical memory tests (18). These structured clinical interviews were applied by a trained investigator. The MMSE scores varied from 0 to 30 points, adjusted for education level. The cutoff point for cognitive impairment was ≤ 13 points for those without schooling and ≤ 18 points for individuals with less than 8 years of education and ≤ 26 points for those over 8 years of education. The N-back tasks measure the accuracy of working memory. The N-back are spoken a series of numbers and asked the participant which number was spoken N position ago: N=0 (0-back), N=1 (1-back), N=2 (2-back) and N=3 (3-back). The maximum score per scale is 10, and the sum of all scales is 80 (total N-back). Declarative memory was assessed by logical memory (LM) tests. It consists of two specific stories told to the individual evoked immediately and 30 min after. Here we used only the scores of the two stories 30 min after to assess the delay recall. The degree of

depression levels were investigated by Beck Depression Inventories-II (BDI-II)(19). Levels of stress were checked by the Perceived Stress Scale (PSS). This scale measures the degree to which individuals perceive situations as stressful during the last month (20).

Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells

Ten milliliters of peripheral blood was collected by venepuncture in the morning (between 10 and 12 h) and the samples were stored into EDTA tubes prior to analyses. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation for 30 min at 900g. Cells were counted by means of microscopy (100x) and viability always exceeded 95%, as judge from their ability to excluded Trypan Blue (Sigma).

Immunophenotyping

A large panel of lymphocyte subpopulations was identified by multi-color flow cytometry in freshly isolated PBMCs. Briefly, PBMCs were washed in flow cytometry buffer (PBS containing 1% FCS and 0.01% sodium azide) and treated with Fc block solution for 20 min. Cells were stained for 30 min with combinations of the follow monoclonal antibodies: anti-CD3 FITC and PECy5 (T cells), anti-CD4 PE (Th cells), anti-CD8 PECy5 (Tc cells), anti-CD19 PE (B cells), anti-CD56 FITC (NK cells), anti-CD28 FITC (late differentiated T cells), anti-CD45RO FITC (memory T cells), anti-CD69 FITC (activated cells), anti-CD45RA FITC (naïve T cells) all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA. Immediately after staining, cells were washed resuspended and analyzed by flow cytometry. For intracellular staining, PBMCs were cultured in a final concentration of 5×10^5 cell/well in RPMI medium with 10% FCS, 50ng/ml PMA (Phorbol-ester) and 1µg/ml Ionomycin (IONO, all from Sigma –Aldrich) for 5 hours at 37°C and in 5% CO₂ atmosphere. Cells were immediately permeabilized and stained according to the manufacturer's instructions (Human Th17/Treg Phenotyping Kit, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A minimum of 20,000 lymphocytes

were identified by size (FSC) and granularity (SSC) and acquired with a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument has been checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) prior to date acquisition. Data were analyzed using the Flowjo V10 software (Tree Star Inc., Ashland, Or, USA).

Statistical Analysis

All variables were tested for homogeneity of variances and normality of distribution by means of the Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. For continuous variables, differences between groups were analyzed by Student t-test or Mann-Whitney U test when appropriate. Statistical interactions between categorical variables were compared by means of the chi-square (χ^2) test. Interrelationships between variables were analyzed by Pearson and Spearman's correlation tests. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences, SPSS Statistics V.18 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The significance level was set at $\alpha=0.05$ (two tailed).

Results

Demographic data and clinical characteristics

Demographic and clinical characteristics of the sample are summarized in Table 1. Both groups were homogeneous regarding age, sex and education. All subjects in both groups had a score higher than the cutoff points established by the MMSE (adjusted for schooling; $t = -2.13$, $p < 0.05$) (Table 1). All patients were taken different drugs that included disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs; methotrexate, hydroxychloroquine, sulfasalazine, leflunomide), glucocorticoids (prednisone) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs; ibuprofen and diclofenac). Data about 28-joint disease activity score (DAS28) (21)

are shown in Table 2. Patients were taking GC on average for 7.01 ± 6.49 yrs (ranging from 0 to 25 yrs).

Cognitive function and psychological distress

A comprehensive analysis of the functional cognitive state was performed in this study. Patients had a reduced cognitive performance compared to healthy subjects (Table 3). Patients with RA had impaired evocative memory as shown by reduced scores of the logical memory tests as compared to controls ($t = -4.96$, $p < 0.0001$). In addition, working memory was significantly impaired as shown by reduced total N-back scores than healthy individuals ($t = -4.53$, $p < 0.0001$). Patients with RA were also more depressed than controls ($t = 2.35$, $p = 0.02$). The perception of stressful situations (PSS) during the last month did not differ between groups ($t = -0.74$, $p > 0.05$).

Immunophenotyping

PBMCs were screened for different lymphocyte markers including cell activation, immunosenescence, as well as regulatory phenotypes (Table 4). B cells (CD3-CD19+) and memory T cells (CD8+CD45RO+) were found significantly reduced in RA patients ($t = -4.06$, $p < 0.0001$ and $t = -3.04$, $p = 0.004$, respectively). In contrast, increased populations of naïve T cells (CD4+CD45RA+; $t = 2.23$, $p < 0.05$), senescence-associated T cells (CD8+CD28- , $t = 2.59$, $p = 0.01$ and CD4+CD28-; $U = 174.0$, $p < 0.05$), Treg cells (CD4+Foxp3+; $t = 2.494$, $p = 0.02$) were observed in patients as compared to controls. The CD4/CD8 ratio did not differ between patients as compared to controls (2.31 ± 0.89 vs. 2.02 ± 0.65 , respectively), $p = 0.22$.

Clinical correlates of cognition and lymphocyte subsets

We first sought to investigate potential clinical correlates of cognitive functions. However, zero-order analyses revealed no significant correlations between CRP levels,

DAS28 and cognitive variables (data not shown). Only duration of disease correlated negatively with total scores of logical memory ($r = -0.45$, $p = 0.01$) and approached a significant correlation with total N-back scores ($r = -0.30$, $p = 0.10$). The duration of GC use also correlated negatively with the PSS scores ($r = -0.41$, $p = 0.02$).

Correlation analyses indicated age-related influences on CD3+CD8+ T cells ($r = -0.46$, $p = 0.001$), NK cells (CD3-CD56+; $r = 0.393$, $p = 0.006$), naïve T cells (CD8+CD45RA+; $r = -0.357$, $p = 0.01$) and Th17 cells (CD4+IL-17+; $r = 0.473$, $p < 0.05$). Furthermore, the duration of GC use correlated positively with Treg cells (CD4+Foxp3+; $r = 0.59$, $p < 0.05$). To further investigate the associations of disease activity with cell subsets, two subgroups of patients were created (less and more severe) accordingly to a median split of DAS28. Patients with more severe symptomatology (i.e. DAS28 ≥ 3.09) had more memory T cells (CD8+CD45RO+; $t = -2.532$, $p = 0.02$), NK T cells (CD3+CD56+; $t = -2.395$, $p = 0.02$) and Th17+ cells (CD4+IL17+; $U = 5.000$, $p < 0.05$) compared with the group less severe (Figure 1).

Relationships between cognition and lymphocyte subsets

We also sought to investigate the relationships between cognitive performance and lymphocyte subsets. The logical memory was found positively correlated with memory T cells (CD8+CD45RO+; $r = 0.37$, $p = 0.01$) and B cells (CD3-CD19+; $r_s = 0.31$, $p < 0.05$). In addition, a strong negative correlation was found between 0-back and activated T cells (CD3+CD69+; $r = -0.92$, $p < 0.0001$) as well as moderate negative correlation between the N-back total and the percentage of CD8+CD28- T cells ($r = -0.43$, $p = 0.004$). To get a better insight into these relationships, the RA patients were classified into two subgroups accordingly the median split of total N-back scores (median = 38). Patients with worse

working memory had more CD8+CD28- T cells than patients with better working memory (20.02 ± 7.85 vs. 13.71 ± 5.96 , $U = 40.50$, $p < 0.05$, respectively).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first work reporting the complex relationships between cognition, disease activity and peripheral lymphocyte subsets in RA. A comprehensive analysis of cognitive performance (declarative and working memory) indicated patients with more pronounced cognitive impairments. Furthermore, data provided here suggest interesting novel relationships between cognition and T-cell subsets.

Data presented here further suggest that patients with RA have poor cognitive performance, concurring previous studies (1-4). It has recently been shown that patients with RA had reduced performance in tests assessing the cognitive spheres of visual-constructional apraxia (1). In addition, individuals with RA had cognitive impairments in domains associated with executive function, visual-spatial learning/memory and verbal learning/memory (2). Several mechanisms are potentially involved with cognitive dysfunction in RA, including the chronic inflammatory condition per se as well as long-term GC use. Glucocorticoids have been linked with cognitive impairment (22-24) and glucocorticoid receptors (GRs) are particularly involved in consolidation and retention of learned information (25). Persistent inflammation may also contribute to cognitive decline (26, 27) and systemic inflammation has also been observed to increase with advancing age in humans (*inflammaging*) (26). Indeed, some studies have previously demonstrated the presence of low-grade inflammation and reduced cognitive performance (26, 28-30). Komulainen et al. (28), in a follow-up study with elderly women, found that elevated serum concentrations of high-sensitivity CRP can predict an increased risk for memory impairment and eventually dementia. In our study, we did not observe a relationship between CRP levels, duration of exposure to GC and memory deficits.

This may be due to possible differences in the dosage of GC taken by individuals with RA and also due to low CRP levels reported. Other dimensions of cognition may be better correlated with disease activity in RA.

RA has been associated with premature immunosenescence. In accordance, we observed several age-related changes in peripheral lymphocyte subsets in RA including a significant drop in B cells (-41%) as well as expansion in Tregs (73%), CD4+CD28- T cells (81%) and CD8+CD28- T cells (38%). The loss of expression of the CD28 molecule is a major phenotypic T-cell change during healthy aging as well as during multiple sclerosis, bipolar disorder and RA (12, 14, 31, 32). The loss of CD28 expression occurs in both CD4+ and CD8+ T cells but is more common in CD8+ T cells (11). The CD28- T cells have reached the late-differentiated stage (senescent) and are highly anergic and resistant to apoptosis (33). CD4+CD28- T cells also express NK-cell surface receptors (KIRs) which provide the ability to produce large amounts of cytokines, favoring the development of RA (33). Regulatory T cells (Tregs) have been extensively studied in chronic inflammatory diseases as they can shutdown effector adaptive immune responses including autoreactive immune cells (34). Our data also concur to previous studies reporting increased expansions of Tregs in RA. Cao et al. (35) showed that patients with RA had more regulatory T cells (CD25^{bright}CD4+) in the synovial fluid when compared with peripheral blood lymphocytes. Although these cells were found increased in RA patients, it is believed that Tregs have their functions impaired. The underlying mechanism is not fully understood, but it has been observed that pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF- α) can impair the suppressive function of Tregs (36).

Peripheral lymphocyte subsets, in particular T cells, have been implicated with cognitive functions. Experimental models have indicated key roles for peripheral lymphocytes in healthy brain functions, including cognition (8, 9, 37). T cells are rarely detected in the brain parenchyma, however are rather found in the 'boundaries' of the brain, in meningeal

structures bathed by cerebrospinal fluid (CSF) (38). The CSF of healthy individuals contains large amounts of memory T cells (CD45RO+) (39). In accordance, we reported a positive relationship between cognitive performance and CD8+CD45RO+ T cells. Animals deficient in T cells are cognitively impaired, and re-population with T cells from wild-type donors can reverse this defect (8). These studies suggest the importance of the integrity of the peripheral adaptive immune system in participating of cognitive functions. In addition, changes in lymphocyte subsets have been observed in patients with mild cognitive impairment (MCI) and Alzheimer's disease (AD). Patients with MCI or AD showed lower percentages of B cells (40, 41) but increased expansions of late-differentiated T cells (CD28-), especially in CD4+ cells (42-44). These data are in line with findings reported here in RA and give further support to the role of peripheral lymphocytes in human cognition. However, it remains to be established whether these changes are correlates of the chronic inflammatory condition or medication.

Some peripheral T-cell subsets have been recently studied in RA and were implicated in physical damage and disease progression. Here, we observed increased expansions of NKT (CD3+CD56+), memory CD8+ T cells and Th17 associated with clinical severity. Of special note, Th17 cells have an inflammatory role and it is characterized by the ability to produce large amounts of cytokines such as IL-17 and IL-22 (45). In accordance to previous work (46), no differences in the frequency of circulating Th17 cells were observed in RA compared with healthy controls. More recently, another study reported increased peripheral Th17 cells in RA as compared with osteoarthritis (47). All studies, including ours, observed an increase in the frequency of Th17 cells in individuals with more severe RA than individuals with less severe form. Interestingly, patients with AD had also increased activity of peripheral Th17 cells (44). Memory T cells (CD8+CD45RO+) have been correlated with levels of IgM rheumatoid factor. The presence of rheumatoid factor provides evidence of a more aggressive

disease development. NKT is a T-cell subset expressing some NK cell markers that can react with self and microbial ligands, leading to activation of B cells. These cells may be thus involved in the aggravation of the disease. However, new studies are needed to better characterize the functional activities of these cells in the synovium.

In conclusion, our data give further support to the hypothesis of accelerated aging in RA. Patients with RA had major cognitive dysfunctions and alterations in certain lymphocyte subsets commonly found in healthy immunosenescence. Furthermore, expansions of activated and senescence-associated T cells were correlated with poor memory performance.

Acknowledgments

We are very grateful to the patients and staff at the Hospital São Lucas (Porto Alegre, Brazil). This work was supported by grants from CNPq (MEB and RG-O) and by a scholarship from CAPES (LEP).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. de Melo LF, Da-Silva SL. Neuropsychological assessment of cognitive disorders in patients with fibromyalgia, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus. *Revista Brasileira De Reumatologia*. 2012;52(2):175-88.
2. Shin SY, Katz P, Wallhagen M, Julian L. Cognitive impairment in persons with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(8):1144-50.
3. Boyd TD, Bennett SP, Mori T, Governatori N, Runfeldt M, Norden M, et al. GM-CSF upregulated in rheumatoid arthritis reverses cognitive impairment and amyloidosis in Alzheimer mice. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(2):507-18.
4. Shin SY, Julian L, Katz P. The Relationship Between Cognitive Function and Physical Function in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2013.
5. Bartolini M, Candela M, Brugni M, Catena L, Mari F, Pomponio G, et al. Are behaviour and motor performances of rheumatoid arthritis patients influenced by subclinical cognitive impairments? A clinical and neuroimaging study. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20(4):491-7.
6. Appenzeller S, Bertolo MB, Costallat LT. Cognitive impairment in rheumatoid arthritis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2004;26(5):339-43.
7. Cohen H, Ziv Y, Cardon M, Kaplan Z, Matar MA, Gidron Y, et al. Maladaptation to mental stress mitigated by the adaptive immune system via depletion of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ cells. *J Neurobiol*. 2006;66(6):552-63.
8. Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8180-5.
9. Brynskikh A, Warren T, Zhu J, Kipnis J. Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain Behav Immun*. 2008;22(6):861-9.
10. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci*. 2006;9(2):268-75.
11. Lindstrom TM, Robinson WH. Rheumatoid arthritis: a role for immunosenescence? *J Am Geriatr Soc*. 2010;58(8):1565-75.
12. Thewissen M, Linsen L, Somers V, Geusens P, Raus J, Stinissen P. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1051:255-62.
13. Koetz K, Bryl E, Spickschen K, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):9203-8.
14. Weyand CM, Fulbright JW, Goronzy JJ. Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. *Exp Gerontol*. 2003;38(8):833-41.

15. Arnett 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(3):315-24.
16. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12(3):189-98.
17. Owen AM, McMillan KM, Laird AR, Bullmore E. N-back working memory paradigm: a meta-analysis of normative functional neuroimaging studies. *Hum Brain Mapp.* 2005;25(1):46-59.
18. Wechsler D. Wechsler Memory Scale - revised manual. San Antonio: Psychological Corporation; 1987.
19. Beck AT, Steer RA, Ball R, Ranieri W. Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. *J Pers Assess.* 1996;67(3):588-97.
20. Luft CD, Sanches Sde O, Mazo GZ, Andrade A. [Brazilian version of the Perceived Stress Scale: translation and validation for the elderly]. *Rev Saude Publica.* 2007;41(4):606-15.
21. Pinheiro GR. Pooled indices to measure rheumatoid arthritis activity – Why and how to use them. *Rev Bras Reumatol.* 2007;47:362-5.
22. Wolf OT, Convit A, McHugh PF, Kandil E, Thorn EL, De Santi S, et al. Cortisol differentially affects memory in young and elderly men. *Behav Neurosci.* 2001;115(5):1002-11.
23. Coluccia D, Wolf OT, Kollias S, Roozendaal B, Forster A, de Quervain DJ. Glucocorticoid therapy-induced memory deficits: acute versus chronic effects. *J Neurosci.* 2008;28(13):3474-8.
24. Almela M, van der Meij L, Hidalgo V, Villada C, Salvador A. The cortisol awakening response and memory performance in older men and women. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(12):1929-40.
25. Jameison K, Dinan TG. Glucocorticoids and cognitive function: from physiology to pathophysiology. *Hum Psychopharmacol.* 2001;16(4):293-302.
26. Trollor JN, Smith E, Agars E, Kuan SA, Baune BT, Campbell L, et al. The association between systemic inflammation and cognitive performance in the elderly: the Sydney Memory and Ageing Study. *Age (Dordr).* 2012;34(5):1295-308.
27. Bauer ME. Chronic stress and immunosenescence: a review. *Neuroimmunomodulation.* 2008;15(4-6):241-50.
28. Komulainen P, Lakka TA, Kivipelto M, Hassinen M, Penttila IM, Helkala EL, et al. Serum high sensitivity C-reactive protein and cognitive function in elderly women. *Age Ageing.* 2007;36(4):443-8.
29. van den Kommer TN, Dik MG, Comijs HC, Jonker C, Deeg DJ. Homocysteine and inflammation: predictors of cognitive decline in older persons? *Neurobiol Aging.* 2010;31(10):1700-9.

30. Phillips AC, Batty GD, van Zanten JJ, Mortensen LH, Deary IJ, Calvin CM, et al. Cognitive ability in early adulthood is associated with systemic inflammation in middle age: the Vietnam experience study. *Brain Behav Immun.* 2011;25(2):298-301.
31. do Prado CH, Rizzo LB, Wieck A, Lopes RP, Teixeira AL, Grassi-Oliveira R, et al. Reduced regulatory T cells are associated with higher levels of Th1/TH17 cytokines and activated MAPK in type 1 bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 2012.
32. Goronzy JJ, Shao L, Weyand CM. Immune aging and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010;36(2):297-310.
33. Goronzy JJ, Weyand CM. Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):225-34.
34. Haque R, Lei F, Xiong X, Bian Y, Zhao B, Wu Y, et al. Programming of regulatory T cells from pluripotent stem cells and prevention of autoimmunity. *J Immunol.* 2012;189(3):1228-36.
35. Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2003;33(1):215-23.
36. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood.* 2006;108(1):253-61.
37. Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, Cohen A, et al. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci.* 2001;21(11):3740-8.
38. Kipnis J, Gadani S, Derecki NC. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(9):663-9.
39. Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2005;26(9):485-95.
40. Richartz-Salzburger E, Batra A, Stransky E, Laske C, Kohler N, Bartels M, et al. Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res.* 2007;41(1-2):174-8.
41. Magaki S, Yellon SM, Mueller C, Kirsch WM. Immunophenotypes in the circulation of patients with mild cognitive impairment. *J Psychiatr Res.* 2008;42(3):240-6.
42. Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Schipper HM, Derhovanessian E, Goldeck D, et al. Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009;17(1):91-103.
43. Pellicano M, Larbi A, Goldeck D, Colonna-Romano G, Buffa S, Bulati M, et al. Immune profiling of Alzheimer patients. *J Neuroimmunol.* 2012;242(1-2):52-9.
44. Saresella M, Calabrese E, Marventano I, Piancone F, Gatti A, Alberoni M, et al. Increased activity of Th-17 and Th-9 lymphocytes and a skewing of the post-thymic differentiation pathway are seen in Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun.* 2011;25(3):539-47.

45. Nakano K, Yamaoka K, Hanami K, Saito K, Sasaguri Y, Yanagihara N, et al. Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naive T cells and D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol.* 2011;186(6):3745-52.
46. Arroyo-Villa I, Bautista-Caro MB, Balsa A, Aguado-Acin P, Nuno L, Bonilla-Hernan MG, et al. Frequency of Th17 CD4+ T cells in early rheumatoid arthritis: a marker of anti-CCP seropositivity. *PLoS One.* 2012;7(8):e42189.
47. Kim J, Kang S, Kwon G, Koo S. Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Lab Med.* 2013;33(1):52-9.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Lymphocyte subsets accordingly to disease severity. Figures (A-C) show that individuals with more severe RA have higher percentages of CD8+CD45RO+ cells (**A**), CD3+CD56+ cells (**B**) and CD4+IL-17+ cells (**C**). Data were analyzed by Mann Whitney and Student t tests. * $p < 0.05$.

Table1. Characteristics of the studied populations.

	RA (n=30)	Healthy controls (n=19)	P-value
Age, years (mean \pm SD)	50.6 \pm 13.45	49.37 \pm 15.23	0.78
Males/females	5/25	4/15	0.70
BMI (mean \pm SD)	26.07 \pm 4.78	25.92 \pm 3.68	0.91
Schooling, years (mean \pm SD)	6.83 \pm 3.80	8.37 \pm 4.64	0.21
MMSE	25.7 \pm 2.8	27.3 \pm 2.1	0.03*
RA duration, years (mean \pm SD)	13.86 \pm 9.84	-	-
Serum CRP (mg/L)	1.4 \pm 1.6	-	-
No. RF positive (<i>n</i>)	28	-	-
Morning stiffness (<i>n</i>)	8	-	-
Swollen joints (mean \pm SD)	2.4 \pm 2.9	-	-
Painful joints (mean \pm SD)	3.1 \pm 5.1	-	-
Treatment			
DMARDs, <i>n</i> (%)	30 (100)	-	-
NSAIDs, <i>n</i> (%)	5 (16.7)	-	-
Glucocorticoids, <i>n</i> (%)	26 (86.7)	-	-

Data shown as mean \pm standard deviation (SD). Abbreviations: body mass index (BMI); Mini-Mental State Examination (MMSE); rheumatoid arthritis (RA); C-reactive protein (CRP); rheumatoid factor (RF); disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs); non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Data analyzed by Student t test.

Table 2. Assessment of disease activity.

DAS28	RA, <i>n</i> (%)
≤ 2.6, remission	12 (40.0)
2.7 - 3.2, low	6 (20.0)
3.3 - 5.1, moderate	11 (36.7)
≥ 5.2, high	1 (3.3)

Abbreviations: disease activity scores (DAS); rheumatoid arthritis (RA).

Table 3. Assessment of cognitive performance and psychological distress.

Scores	RA	Healthy controls	P-value
LM 1	5.3±2.6	9.0±3.1	0.0001***
LM 2	3.3±2.7	6.9±2.8	0.0001***
LM total	8.6±4.5	15.9±5.3	0.0001***
0-back	9.9±0.2	9.8±0.3	0.27
0-back	9.9±0.5	9.9±0.5	0.91
1-back	5.8±3.2	8.1±2.2	0.01*
1-back	5.5±3.7	8.7±1.8	0.0001***
2-back	2.1±1.6	4.9±1.8	0.0001***
2-back	2.2±1.9	4.9±2.8	0.0001***
3-back	1.7±1.6	3.5±1.6	0.001*
3-back	1.7±1.7	2.9±2.0	0.03*
Total N-back	38.7±11.1	52.8±8.3	0.0001***
BDI-II	16.1 ± 11.09	9.0 ± 7.39	0.02*
PSS	21.27 ± 10.51	21.70 ± 8.96	0.88

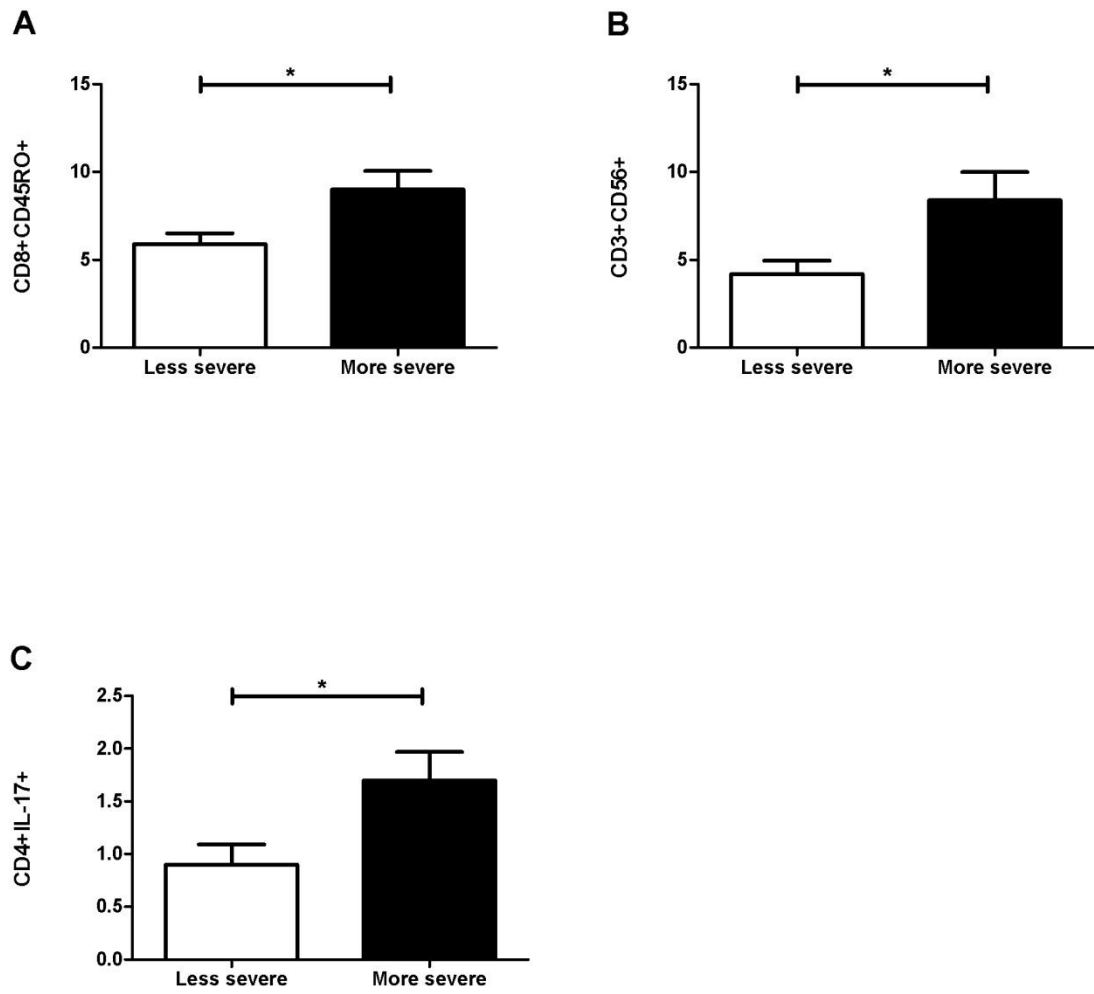
Data shown as mean ± standard deviation (SD). Abbreviations: rheumatoid arthritis (RA); logic memory (LM); Beck Depression Inventories (BDI); perceived stress scale (PSS). Data analyzed by Student t test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

Table 4. Immunophenotyping of lymphocyte subsets.

Markers	RA	Healthy controls	P-value
CD3+CD4+	48.22 ± 9.94	42.28 ± 11.84	0.07
CD3+CD8+	22.86 ± 6.65	21.91 ± 6.73	0.63
CD3-CD19+	6.05 ± 3.16	10.29 ± 3.92	0.0001***
CD3+CD56+	6.35 ± 5.19	4.54 ± 2.75	0.18
CD3-CD56+	13.40 ± 7.47	10.21 ± 5.65	0.13
CD4+CD45RA+	20.77 ± 9.74	14.75 ± 7.81	0.03*
CD8+CD45RA+	18.96 ± 5.87	17.34 ± 4.78	0.33
CD4+CD45RO+	25.25 ± 9.68	29.42 ± 8.41	0.13
CD8+CD45RO+	7.51 ± 3.66	10.96 ± 4.03	0.004*
CD4+CD28+	42.48 ± 10.76	39.59 ± 11.01	0.38
CD8+CD28+	11.78 ± 4.47	14.26 ± 5.14	0.09
CD4+CD28-	6.86 ± 6.18	3.79 ± 3.47	0.04*
CD8+CD28-	16.99 ± 7.58	12.32 ± 4.28	0.01*
CD3+CD69+	2.18 ± 1.35	2.50 ± 4.08	0.75
CD4+IL17+	1.42 ± 0.74	1.75 ± 1.50	0.51
CD4+Foxp3+	2.22 ± 0.83	1.28 ± 0.83	0.02*

Data shown as mean ± standard deviation (SD). Statistical significant differences are indicated by Student t tests: * p < 0.05, *** p < 0.0001.

FIGURE 1.



3. CAPÍTULO 3

3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nessa dissertação apoiam a hipótese de um envelhecimento acelerado na AR. Verificamos um prejuízo cognitivo acentuado e várias alterações em subtipos linfocitários que sugerem uma imunossenescência acelerada.

Embora existam estudos prévios que identificaram disfunções cognitivas em pacientes com AR, esse é o primeiro trabalho que verificou relações entre o sistema imunológico e a cognição. O prejuízo cognitivo foi evidenciado pela aplicação de questionários específicos. Estes questionários nos forneceram escores de avaliação do desempenho cognitivo geral e exclusão da presença de demência (mini exame do estado mental; MMSE) e dois diferentes tipos de memória, memória de trabalho (tarefa *N-back*) e memória declarativa (memória lógica). Além disso, nós pudemos constatar a presença de uma correlação positiva entre células T de memória (CD8+CD45RO+) e células B (CD3-CD19+) com performance cognitiva. Estudos experimentais com roedores tem demonstrado os efeitos benéficos do sistema imune sobre o sistema nervoso central (SNC). No entanto, em condições fisiológicas, as células T são raramente detectadas no parênquima cerebral, e acredita-se que as células T estejam localizadas nos 'limites cerebrais' (leptomeninges, plexo coroide e espaço perivascular) banhados pelo fluido cérebro-espinhal (FCS). Estudos tem mostrado que o fluido cérebro-espinhal apresenta grandes quantidades de células T de memória central (CD45RO+). Como mencionado anteriormente, em nosso estudo pudemos observar que indivíduos com maiores porcentagens de células CD45RO+ apresentam um melhor desempenho de memória do que indivíduos com porcentagens inferiores. Além disso, evidências suportam que as células T, principalmente células T autoreativas a um antígeno do SNC, são importantes para a plasticidade cerebral adulta, auxiliando no processo da neurogênese. Por outra via, estudos tem focado sobre o sistema imune de pessoas com comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer, cujo comprometimento cognitivo e demência são características bem estabelecidas. No entanto, em ambas as patologias os indivíduos apresentam baixas porcentagens de células B e expansão de células diferenciadas tardiamente (CD28-), especialmente em células CD4+. Estes dados

corroboram com os encontros reportados aqui na AR e fornecem indícios da participação dos linfócitos periféricos na cognição humana.

Embora alguns estudos tenham relacionado à exposição aos glicocorticoides e níveis de proteína C reativa com um mau funcionamento cognitivo, neste trabalho não foram observadas tais relações. Especula-se que os pacientes com prognóstico mais severo, e/ou uso mais intenso de glicocorticoides, possam replicar mais claramente essas relações. Além disso, indivíduos acometidos pela doença em questão, apresentaram um grau de depressão mais elevado do que controles saudáveis. Por outra via, ambos os grupos não tiveram diferenças em relação à percepção do estresse psicossocial nos 30 dias antecessores a entrevista.

AR é caracterizada por imunossenescência prematura. Com base nisso, alterações quantitativas e fenotípicas podem ser observadas nas subpopulação de células imunológicas periféricas. Neste estudo, verificamos a presença de subtipos linfocitários que caracterizam o processo de imunossenescência. Sendo assim, pudemos confirmar que pessoas com AR apresentam uma expansão na população de células T regulatórias senescentes (CD4+CD28-, CD8+CD28-) e células Treg (CD4+Foxp3+). No entanto, um aumento na população de células Treg deveria ser um bom prognóstico para os pacientes com AR, visto a capacidade que estas células em suprimir células imunes autorreativas, se não fosse a ação de citocinas que atenuam a capacidade supressora das células T reg. Além disso, identificamos um aumento na população de células de memória (CD8+CD45RO+), células NKT (CD3+CD56+) e células Th17 no grupo de pacientes com AR mais severa se comparado com o grupo menos severa. Indicando uma possível ligação entre severidade clínica e os respectivos subtipos linfocitários citados acima.

A partir da identificação de prejuízo cognitivo e alterações linfocitárias, partimos para investigar a associação entre sistema imune e cognição. No entanto, observamos que subtipos linfocitários, especificamente células de memória (CD8+CD45RO+) e células B (CD3-CD19+) se correlacionaram positivamente com o teste de memória lógica. Por outra via, os linfócitos T ativados apresentaram uma correlação negativa com o teste *N-back*.

Concluindo, levando em consideração o exposto, os achados deste trabalho corroboram com estudos anteriores que observaram prejuízo cognitivo em pacientes com AR. Além disso, nosso estudo fornece indícios da relação entre subtipos de

células imunológicas e cognição. No entanto, mais estudos a respeito desta relação deveriam ser realizados com o objetivo de verificar se as células imunes influenciam a cognição ou se a cognição influencia as células imunes. O desenho experimental deste estudo não permitiu responder esta questão, mas desperta para a necessidade de explorar melhor estas relações.

4. REFERÊNCIAS

1. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Jul;51 Suppl 5:v3-11.
2. Korb A, Pavenstadt H, Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):447-54.
3. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008 May-Jun;253(1-2):92-101.
4. Klareskog L, Padyukov L, Ronnelid J, Alfredsson L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol*. 2006 Dec;18(6):650-5.
5. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care*. 2012 Nov;18(13 Suppl):s295-302.
6. Cavalcante LO, Melo MR, Dinis VG, Castro RB, Souza BD, Longui CA. Quantitation of glucocorticoid receptor alpha and NF-kappaB pathway mRNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Genet Mol Res*. 2010;9(4):2300-10.
7. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005 Mar;4(3):130-6.
8. Goronzy JJ, Weyand CM. Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):249.
9. Klareskog L, Malmstrom V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol*. 2011 Apr;23(2):92-8.
10. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, le Cessie S, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 2007 Feb;56(2):425-32.
11. Dorner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 May;16(3):246-53.
12. Firestein GS. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*. 2005 Jun;11(3 Suppl):S39-44.
13. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2205-19.
14. Lina C, Conghua W, Nan L, Ping Z. Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th1/Th2, Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*. 2011 Aug;31(4):596-605.
15. Lindstrom TM, Robinson WH. Rheumatoid arthritis: a role for immunosenescence? *J Am Geriatr Soc*. 2010 Aug;58(8):1565-75.
16. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):364-71.
17. Nakano K, Yamaoka K, Hanami K, Saito K, Sasaguri Y, Yanagihara N, et al. Dopamine induces IL-6-dependent IL-17 production via D1-like receptor on CD4 naive T cells and D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol*. 2011 Mar 15;186(6):3745-52.

18. Kim J, Kang S, Kwon G, Koo S. Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Lab Med.* 2013 Jan;33(1):52-9.
19. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:417-34.
20. Zizzo G, De Santis M, Bosello SL, Fedele AL, Peluso G, Gremese E, et al. Synovial fluid-derived T helper 17 cells correlate with inflammatory activity in arthritis, irrespectively of diagnosis. *Clin Immunol.* 2011 Jan;138(1):107-16.
21. Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM, 2nd, Kolls JK, Pope RM, Shahrara S. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2010 Mar 15;184(6):3233-41.
22. Paradowska A, Masliniski W, Grzybowska-Kowalczyk A, Lacki J. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007 Sep-Oct;55(5):329-34.
23. Leipe J, Skapenko A, Lipsky PE, Schulze-Koops H. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):93.
24. Haque R, Lei F, Xiong X, Bian Y, Zhao B, Wu Y, et al. Programming of regulatory T cells from pluripotent stem cells and prevention of autoimmunity. *J Immunol.* 2012 Aug 1;189(3):1228-36.
25. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature.* 2007 Feb 15;445(7129):766-70.
26. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood.* 2006 Jul 1;108(1):253-61.
27. Goronzy JJ, Shao L, Weyand CM. Immune aging and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010 May;36(2):297-310.
28. Bauer ME. Chronic stress and immunosenescence: a review. *Neuroimmunomodulation.* 2008;15(4-6):241-50.
29. Goronzy JJ, Weyand CM. Rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2005 Apr;204:55-73.
30. Weyand CM, Fulbright JW, Goronzy JJ. Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. *Exp Gerontol.* 2003 Aug;38(8):833-41.
31. Costenbader KH, Prescott J, Zee RY, De Vivo I. Immunosenescence and rheumatoid arthritis: does telomere shortening predict impending disease? *Autoimmun Rev.* 2011 Jul;10(9):569-73.
32. Weyand CM, Goronzy JJ. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002 Jun;29(6):1141-6.
33. Thewissen M, Linsen L, Somers V, Geusens P, Raus J, Stinissen P. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1051:255-62.
34. Goronzy JJ, Weyand CM. Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):225-34.
35. Straub RH, Scholmerich J, Cutolo M. The multiple facets of premature aging in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Oct;48(10):2713-21.
36. van Vollenhoven RF. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol.* 2009 Oct;5(10):531-41.
37. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2010 Sep 25;376(9746):1094-108.

38. Zayat AS, Conaghan PG, Sharif M, Freeston JE, Wenham C, Hensor EM, et al. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs have a significant effect on detection and grading of ultrasound-detected synovitis in patients with rheumatoid arthritis? Results from a randomised study. *Ann Rheum Dis*. 2011 Oct;70(10):1746-51.
39. Kovalchik SA, Charles-Schoeman C, Khanna D, Paulus HE. An association study of disease activity score components and patient satisfaction with overall health for early RA patients on non-biologic DMARD therapy. *Rheumatol Int*. 2012 Sep;32(9):2725-9.
40. Breedveld FC, Combe B. Understanding emerging treatment paradigms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13 Suppl 1:S3.
41. Dixon WG, Kezouh A, Bernatsky S, Suissa S. The influence of systemic glucocorticoid therapy upon the risk of non-serious infection in older patients with rheumatoid arthritis: a nested case-control study. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):956-60.
42. Borowski LC, Lopes RP, Gonzalez TP, Dummer LA, Chies JA, Silveira IG, et al. Is steroid resistance related to multidrug resistance-I (MDR-I) in rheumatoid arthritis? *Int Immunopharmacol*. 2007 Jun;7(6):836-44.
43. Baschant U, Lane NE, Tuckermann J. The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Nov;8(11):645-55.
44. Trollor JN, Smith E, Agars E, Kuan SA, Baune BT, Campbell L, et al. The association between systemic inflammation and cognitive performance in the elderly: the Sydney Memory and Ageing Study. *Age (Dordr)*. 2012 Oct;34(5):1295-308.
45. Shin SY, Katz P, Wallhagen M, Julian L. Cognitive impairment in persons with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012 Aug;64(8):1144-50.
46. Coluccia D, Wolf OT, Kollias S, Roozendaal B, Forster A, de Quervain DJ. Glucocorticoid therapy-induced memory deficits: acute versus chronic effects. *J Neurosci*. 2008 Mar 26;28(13):3474-8.
47. Shin SY, Julian L, Katz P. The Relationship Between Cognitive Function and Physical Function in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2013 Jan 15.
48. de Melo LF, Da-Silva SL. Neuropsychological assessment of cognitive disorders in patients with fibromyalgia, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus. *Revista Brasileira De Reumatologia*. 2012 Mar-Apr;52(2):175-88.
49. Ballesteros S, Mayas J, Reales JM. Cognitive function in normal aging and in older adults with mild cognitive impairment. *Psicothema*. 2013 Feb;25(1):18-24.
50. Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Lofgren S, et al. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005 May;60(5):556-65.
51. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci*. 2006 Feb;9(2):268-75.
52. Almela M, van der Meij L, Hidalgo V, Villada C, Salvador A. The cortisol awakening response and memory performance in older men and women. *Psychoneuroendocrinology*. 2012 Dec;37(12):1929-40.
53. Gorelick PB. Role of inflammation in cognitive impairment: results of observational epidemiological studies and clinical trials. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Oct;1207:155-62.
54. Komulainen P, Lakka TA, Kivipelto M, Hassinen M, Penttila IM, Helkala EL, et al. Serum high sensitivity C-reactive protein and cognitive function in elderly women. *Age Ageing*. 2007 Jul;36(4):443-8.

55. van den Kommer TN, Dik MG, Comijs HC, Jonker C, Deeg DJ. Homocysteine and inflammation: predictors of cognitive decline in older persons? *Neurobiol Aging*. 2010 Oct;31(10):1700-9.
56. Zhang R, Kadar T, Sirimanne E, MacGibbon A, Guan J. Age-related memory decline is associated with vascular and microglial degeneration in aged rats. *Behav Brain Res*. 2012 Dec 1;235(2):210-7.
57. Jameison K, Dinan TG. Glucocorticoids and cognitive function: from physiology to pathophysiology. *Hum Psychopharmacol*. 2001 Jun;16(4):293-302.
58. Bi BT, Lin HB, Cheng YF, Zhou H, Lin T, Zhang MZ, et al. Promotion of beta-amyloid production by C-reactive protein and its implications in the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2012 Feb;60(3):257-66.
59. Gimeno D, Marmot MG, Singh-Manoux A. Inflammatory markers and cognitive function in middle-aged adults: the Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology*. 2008 Nov;33(10):1322-34.
60. Lin HB, Yang XM, Li TJ, Cheng YF, Zhang HT, Xu JP. Memory deficits and neurochemical changes induced by C-reactive protein in rats: implication in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009 Jul;204(4):705-14.
61. Phillips AC, Batty GD, van Zanten JJ, Mortensen LH, Deary IJ, Calvin CM, et al. Cognitive ability in early adulthood is associated with systemic inflammation in middle age: the Vietnam experience study. *Brain Behav Immun*. 2011 Feb;25(2):298-301.