

# **Estudo de células com actividade reguladora, no sangue periférico, em doentes com Artrite Reumatóide**

Pedro Correia<sup>1</sup>, Cátia Duarte<sup>2</sup>, Ana Henriques<sup>3</sup>, Artur Paiva<sup>3</sup>, José António Pereira da Silva<sup>2</sup>

## **Afiliação:**

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

<sup>2</sup> Serviço de Reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal

<sup>3</sup> Centro de Histocompatibilidade do Centro, Portugal

## **Endereço:**

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Rua Larga

3004-504 Coimbra

Telf: +351- 239857700 / Fax: +351-239823236

*pedro.correia.med@gmail.com*

## Resumo

**Introdução:** A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença inflamatória auto-imune crónica, caracterizada por inflamação sinovial articular, que é orquestrada tanto por imunidade inata como por respostas adaptativas. Recentemente tem sido dada atenção à contribuição de várias sub-populações de células dendríticas (DCs), em particular à função das células dendríticas linfoplasmocitóides (pDCs). As pDCs provavelmente desempenham um papel central no restabelecimento de tolerância imunológica através da expansão e/ou indução de células T reguladoras (Tregs). Tal evidência tem despertado o interesse em explorar estratégias de restabelecimento de tolerância imunológica e atingir supressão da doença a longo prazo.

**Objectivos:** O presente estudo foi efectuado de forma a explorar o número e função de pDCs e Tregs, e portanto a sua contribuição, em doentes com Artrite Reumatóide.

**Métodos:** Os doentes com Artrite Reumatóide foram agrupados de acordo com a actividade da doença segundo a definição EULAR em grupo de baixa actividade (DAS28  $3v < 3,2$ ) e grupo de Moderada-Alta Actividade (DAS28  $3v > 3,2$ ). A proporção e os números absolutos de pDCs e Tregs foram avaliados por citometria de fluxo no sangue periférico de doentes com AR e grupo controlo (GC). Depois do *sorting* de células a quantificação genética da expressão de mRNA para o FOXP3, TGF- $\beta$ 1, IDO e ICOS-L foi feita através de PCR em tempo real.

**Resultados:** Verificámos, em doentes com AR, níveis inferiores de número absoluto e frequência de Tregs bem como uma tendência para o aumento de expressão génica de FoxP3 e TGF- $\beta$ 1, em comparação com GC. De forma similar, a frequência e número absoluto de pDCs foram mais baixos em ambos os grupos com AR do que no GC. O decréscimo em número absoluto foi particularmente marcado em doentes com alta actividade de doença (AAD). Também neste grupo a expressão génica de IDO pelas pDCs estava aumentada

quando comparada com os controlos saudáveis, no entanto não foi detectada diferença estatística em relação à expressão génica de ICOS-L.

**Conclusão:** O presente estudo demonstra uma notável depleção de pDCs e Tregs no sangue periférico de doentes com AR, o que associado à sua função, percebida como anti-inflamatória, enfatiza o papel crucial das Tregs na manutenção da auto-tolerância imunológica.

**Palavras-chave:** Artrite Reumatóide, Células T reguladoras, Células dendríticas linfoplasmocitóides, Indoleamina 2,3-dioxigenase, Auto-imunidade

## **Abstract**

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by articular synovial inflammation, which is orchestrated by both innate and adaptive immune responses. Recently, attention has focused upon the relative contribution of distinct DC subsets to inflammatory processes, particularly in the function of plasmacytoid dendritic cells (pDC). pDCs likely play a central role in re-establishing immune tolerance via the expansion and/or induction of Treg cells. This has increased the interest in exploring strategies to re-establish immune tolerance and provide long-term disease suppression.

**Objective:** The present study was undertaken to explore the number and function of pDCs and Tregs, and therefore their contribution, in patients with RA.

**Methods:** The proportion and absolute numbers of pDCs and Tregs were evaluated by flow cytometry in the peripheral blood of patients with RA. In addition, after cell sorting, we quantified the mRNA expression of IDO, ICOS-L, Foxp3 and TGF- $\beta$ 1 among these cell subsets by real time PCR.

**Results:** We noted in RA patients a lower absolute number and frequency of peripheral Tregs and a trend for an increase in FoxP3 and TGF- $\beta$ 1 gene expression compared to NC. In a similar way, peripheral pDCs frequency and absolute numbers were lower in both RA groups than in NC group. The decrease of absolute numbers was particularly marked in those patients with high disease activity. Also, in this latter group the IDO gene expression was increased in pDCs when compared to healthy subjects, while in ICOS-L gene expression, no significant differences were found between the studied groups.

**Conclusion:** In summary, this study demonstrates that the notable pDC and Treg depletion in blood circulation of RA patients, associated with their net anti-inflammatory function, emphasizes the crucial role for Treg cells in maintaining immunological self-tolerance.

**Keywords:** Rheumatoid Arthritis, Regulatory T cells, Plasmacytoid dendritic cells, Indoleamine 2,3-dioxygenase, Autoimmunity

## Introdução

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença inflamatória sistémica crónica que é caracterizada pela actividade imunológica persistente e intensa, destruição local de osso e cartilagem e uma variedade de manifestações sistémicas. Os factores responsáveis pela indução e/ou progressão são ainda muito pouco compreendidos mas poderão envolver interacções entre imunidade inata e específica (1). Os mecanismos de regulação imunológica provavelmente desempenham um papel na limitação da AR (2). As células T reguladoras (Tregs) podem exercer a sua actividade supressiva através de diferentes mecanismos de forma a eliminar linfócitos efectores auto-reactivos, por exemplo, no contacto *cell-to-cell*, através da via do antígeno 4 das células T citotóxicas (CTLA-4), são capazes de activar vias apoptóticas que conduzem à morte das células efectoras (3-5). Por outro lado, secretam moléculas solúveis como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , promovendo um *milieu* anti-inflamatório e bloqueando portanto os estímulos de células efectoras (6,7)

A expressão do factor de transcrição “forkhead box P3” (FoxP3) é característica das Tregs e é necessário para a sua geração e manutenção. Apesar de apenas constituírem apenas 5-7% das células T CD4<sup>+</sup> periféricas, onde funcionam de forma a manter o balanço homeostático do sistema imunitário (8), estão a surgir evidências crescentes que as Tregs estão envolvidas directamente na regulação de processos imunológicos (9,10). Aliás, têm sido descritos défices quantitativos e funcionais de Tregs em doentes com AR. O equilíbrio entre células efectoras e reguladoras pode determinar a velocidade de progressão e a severidade da doença, pelo menos na Artrite Induzida pelo Colagénio (11). Muitas células estão envolvidas na indução das Tregs. Destas, as células dendríticas (DCs), altamente plásticas na sua função, poderão estar entre as mais eficientes nesta indução, dada a sua capacidade de interagir

fortemente com as células T. Neste sentido, uma estimulação deficiente das células T pelas DCs, demonstrada em ratinhos, parece surgir como uma possível causa da doença (12).

O estado de maturação ideal das DC (imaturas, semi-maduro e maduro), e os melhores antígenos, para atingir a tolerância em doenças auto-imunes continua a ser tema de debate. DCs em todos os estados de maturação já foram descritas como indutoras de tolerância. As vias de sinalização molecular que induzem as DCs linfoplasmocitoides (pDCs) a promover a maturação de Tregs não estão inteiramente compreendidas. Pensa-se que a expressão, por parte das pDCs, da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) desempenha um papel muito significativo na indução de Tregs mediada por pDCs (13-16). Contudo, é ainda incerto se as DCs humanas *in vivo* exploram mecanismos similares de indução de Tregs, que poderiam facilitar o restabelecimento de tolerância no contexto de doença auto-imune.

Adicionalmente, o co-estimulador induzível (ICOS), um membro da família CD28 das células T, está também envolvido na indução de IL-10, que por sua vez contribui para a promoção da anergia nas células T efectoras. A ICOS é expressa em células T CD4<sup>+</sup> após activação via TCR (17) e interage especificamente com o seu ligando, ICOS-L, em células apresentadoras de antígenos (APCs) como as DCs (18). Em contraste do que acontece com as DCs mielóides, o nível de expressão de ICOS-L em pDCs é maior em células maduras do que imaturas (19).

Portanto, tendo em conta a pouca informação disponível do papel *in vivo* de tais subpopulações celulares no despoletar de artrite e particularmente na regulação da quebra de tolerância a auto-antígenos relacionados com a artrite, analisámos as frequências de pDCs e Tregs, assim como a expressão de mRNA de IDO, ICOS-L, TGF- $\beta$ 1 e FoxP3, de forma a explorar a contribuição das DCs no desenvolvimento de Tregs em ambiente de doença auto-imune humana.

## **Materiais e Métodos**

### *Doentes e Controlos*

Foram incluídos doentes com o diagnóstico de Artrite Reumatóide de acordo com os critérios de classificação ACR 1987 (20), com idade superior a 18 anos e que aceitassem participar no estudo, seguidos no serviço de Reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Foram excluídos do estudo doentes com neoplasias associadas, outras doenças inflamatórias auto-ímmunes, doenças infecciosas activas, amiloidose secundária, sob terapêutica biológica ou que não dessem consentimento.

Os doentes com AR foram agrupados de acordo com a actividade da doença segundo a definição EULAR em grupo de baixa actividade ( $DAS28_{3v} < 3,2$ ) e grupo de Moderada-Alta Actividade ( $DAS28_{3v} > 3,2$ ) (21).

O Grupo Controlo incluía indivíduos maiores de idade, saudáveis (baseado em auto-declaração e avaliação clínica básica de acordo com protocolo standardizado), sem história familiar de doenças auto-ímmunes e sem qualquer relação de parentesco ou outra com os doentes incluídos e que aceitassem participar voluntariamente no estudo.

O estudo respeitou os princípios da Declaração de Helsínquia, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética local. Todos os intervenientes assinaram o consentimento informado.

No momento de inclusão dos doentes do estudo foram colhidos os seguintes dados clínicos: Articulações tumefactas (AT) (em 28), articulações dolorosas (em 28) Velocidade de sedimentação (VS), Proteína C Reactiva (PCR), DAS 28 3v e terapêutica actual. A avaliação articular, com contagem de articulações dolorosas e tumefactas, foi avaliada por um Reumatologista com experiência em Artrite Reumatóide de modo a reduzir a variabilidade inter-observador.



Por avaliação dos processos únicos hospitalares foi recolhida informação relativa à AR: duração da doença, presença de Factor Reumatóide (FR), Presença de Anti-CCP e presença de erosões.

#### *Amostras sanguíneas*

Foi colhida uma amostra de 20 ml de sangue periférico (SP) de cada participante no dia da inclusão e da avaliação clínica. As amostras foram enviadas para o laboratório identificadas com um número de código e a análise foi efectuada sem o conhecimento da presença ou não da patologia.

#### *Coloração por Imunofluorescência das células periféricas Tregs e pDCs*

Para identificarmos as células Tregs e pDCs recorremos a anticorpos monoclonais. Para as Tregs utilizou-se o anti-CD25 FITC (clone M-A251; Pharmingen BD, San Diego, C.A., USA), anti-CD127 PE (clone hIL-7R-M21; BD, San Jose, C.A., USA) e anti-CD4 PerCP-cy5.5 (clone SK3; BD, San Jose, C.A., USA), enquanto que para as pDCs realizou-se com o recurso ao anti-CD45-FITC (clone HI30, Pharmingen BD, San Diego, C.A., USA), anti-CD123 PE (clone 7G3, Pharmingen BD, San Diego, C.A., USA) e anti-HLA-DR PerCP (clone G46-6, Pharmingen BD, San Diego, C.A., USA) que foram adicionados a cada tubo, respectivamente. Depois de brevemente agitadas, as células foram sequencialmente incubadas no escuro à temperatura ambiente durante 15 minutos (min). Em seguida, adicionou-se 2 ml de solução Facs Lysing (BDB, San Jose, CA) previamente diluída a 1:10 (vol:vol) em água destilada e depois de 10 min de incubação, as células foram lavadas com 2 ml de *PBS* e re-suspendeu-se em 0,5 ml de *PBS* antes da análise por citometria de fluxo.

### *Análise e aquisição dos dados através de citometria de fluxo*

As células em suspensão foram preparadas e coradas durante 15 min no escuro à temperatura ambiente com diluições ótimas para cada anticorpo. Os resultados mostram a percentagem positiva de células em cada subconjunto de células avaliadas dentro dos diferentes subconjuntos de células T, depois de 300 000 eventos. A identificação e quantificação das células Tregs foram realizadas tendo em consideração o seguinte fenótipo: CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>bright</sup> e CD127<sup>-/low</sup>; as pDCs foram identificadas como sendo HLA-DR<sup>+</sup> e CD123<sup>bright</sup>. Finalmente, a expressão dos marcadores da superfície das células foi avaliada usando o citómetro de fluxo (FACSCalibur; BD, San Jose, C.A., USA) e os dados foram analisados com o software Infinicyt (Cytognos, Espanha).

### *Sorting das células*

Tal como outros investigadores, usámos a expressão do CD127 como um biomarcador viável da superfície para diferenciar as células efectoras (CD127<sup>+</sup>) das Tregs (CD127<sup>-/low</sup>) em humanos (21). Assim, células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup>/CD127<sup>-low</sup> são definidas como Tregs neste trabalho, tal como as pDCs DR<sup>+</sup>/CD123<sup>bright</sup> foram purificadas usando FACS Aria cell sorter (BD, San Jose, C.A., USA).

A pureza das populações de células isoladas foi avaliada, sendo consistentemente superior a 90%.

### *Análise da expressão génica*

O isolamento do ARN das células Treg e das pDCs foi realizado recorrendo ao kit RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A integridade e quantificação do ARN foram analisadas usando o 6000 Nano Chip® Kit, no Agilent 2100 bioanalisador (Agilent, Walbronn, Alemanha). Um micrograma de ARN

foi transcripto reversamente com o SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System para o RT-PCR (Invitrogen, California, USA), usando oligo(dT) e hexâmeros aleatórios de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação relativa da expressão do gene por PCR de tempo-real foi realizada usando o termociclador LightCycler 480 II (Roche, Basel, Suíça). A normalização para a quantificação da expressão do gene realizou-se com o kit geNorm Housekeeping Gene Selection Human Kit (Primer Design, Southampton, UK) e o software geNorm (Ghent University Hospital, Center for Medical Genetics, Ghent, Bélgica) para seleccionar os genes óptimos para este estudo [21].

As reacções de RT-PCR utilizaram especificamente o QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hilden, Alemanha) com os primers otimizados para FOXP3 (QT00048286), IDO (QT00000504) e TGFB1 (QT00000728) e controlos endógenos ATP5B (QT00055622), B2M (QT00088935), RRN18S (QT00199367) e SDHA (QT01668919) juntos com o kit QuantiTect SYBR Green PCR Kit Gene expression (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. As reacções foram realizadas recorrendo ao seguinte perfil térmico: 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos (seg) a 95°C, 30 seg a 60°C e 30 seg a 72°C. A análise quantitativa dos resultados do RT-PCR foi realizada com o software Lightcycler 480 (Roche, Basel, Alemanha) e a quantificação foi realizada no software qBase<sup>Plus</sup> package (Biogazelle, Zulte, Bélgica).

#### *Análise estatística*

A avaliação estatística dos dados foi realizada usando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney e as correlações entre os grupos foram avaliadas pela correlação não-paramétrica de Spearman. Os resultados são expressos em média (média ± desvio padrão). A

análise estatística foi realizada com o software SPSS Inc, Chicago, USA e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de  $p$  é inferior a 0,05.

## **Resultados**

*População estudada: Doentes com AR de baixa e alta actividade da doença e controlos saudáveis*

Quarenta e dois sujeitos participaram no presente estudo, entre os quais vinte e quatro AR doentes, dez com elevada actividade da doença (90,0% do sexo feminino com idade média de  $32\pm 11$  anos) (grupo AAD) e dezanove com baixa actividade da doença (94,4% do sexo feminino com idade média de  $32\pm 11$  anos) (grupo BAD). Trinta controlos saudáveis (84,6% do sexo feminino com média de idade  $30\pm 12$ ) (grupo GC) sem qualquer processo inflamatório foram também incluídos. Não foram observadas diferenças de género e idade entre os três grupos de indivíduos.

Como esperado, na dependência de grupos classificados, doentes com a doença activa apresentam um número significativamente maior de articulações tumefactas e dolorosas, bem como velocidades de sedimentação (VS) mais elevadas. Os grupos AR apresentam resultados similares em relação à positividade de Factor Reumatóide (FR) (50,0 vs 66,7%,  $p=0,367$ ), anticorpos Anti-CCP (50,0 vs 81,8%,  $p=0,280$ ) e erosões (92,3 vs 88,9%,  $p=0,784$ ). Aproximadamente 35% dos pacientes em ambos os grupos encontravam-se sob corticoterapia ( $p= n.s.$ ), não sendo detectadas diferenças para a terapia com metotrexato.

### *Frequência e caracterização funcional das células T reguladoras periféricas CD25<sup>bright</sup>/CD127<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup>*

Considerando uma possível linfopenia em pacientes com AR, medimos o número absoluto de células T periféricas, CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup>, que foram por nós definidas como células T reguladoras (Tregs). Neste estudo encontramos um número absoluto menor (células/ $\mu$ l no SP) de Tregs nos grupos com AR comparado com GC ( $p < 0,05$ ), alcançando significância estatística no grupo BAD (Tabela 1). Para além disso, verificámos também frequências relativas significativamente mais baixas de Tregs em AR em comparação com GC ( $p < 0,05$ ), sendo particularmente baixa no grupo AAD (Tabela 1). Por outro lado, a percentagem de células Treg no subgrupo de células T CD4<sup>+</sup> foi similar nos três grupos em estudo.

Após o *sorting* das células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>low</sup> observámos nestas células uma tendência para o aumento da expressão do gene FoxP3 e TGF- $\beta$ 1 no grupo AR em comparação com o GC, no entanto não há significância estatística (Figura 2).

### *Frequência e caracterização funcional das pDCs periféricas*

As pDCs foram identificadas pela combinação da expressão do CD123 e HLA-DR e com base nas suas propriedades de dispersão da luz pelo seu tamanho (FSC) e complexidade (SSC), intermédios entre linfócitos e monócitos. Como é mostrado na Tabela 1, a frequência e o número absoluto de pDCs no SP (cell/ $\mu$ l) são significativamente menores em ambos os grupos AR do que no GC. A diminuição do número absoluto é particularmente visível em pacientes com AAD ( $p < 0,05$ ).

Quando analisámos a expressão génica do IDO notámos um forte aumento nas pDCs de doentes com AAD em comparação com o grupo controlo ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, não

verificámos diferenças significativas entre os três grupos em estudo na expressão do gene ICOS-L.

### *Correlações entre os diferentes marcadores imunológicos*

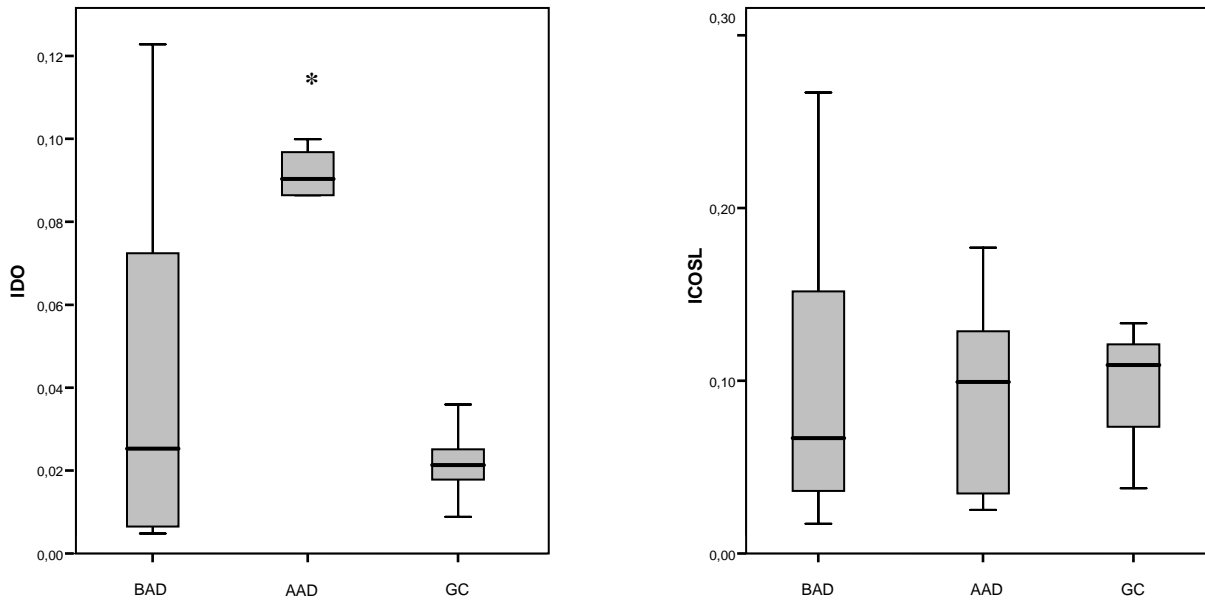
Temos a destacar que as frequências relativas de pDCs e Tregs apresentaram uma correlação linear positiva moderada a forte ( $r=0,655$   $p<0,001$ ) assim como o valor absoluto de pDC e o valor absoluto de Treg apresentaram também uma correlação linear moderada ( $r=0,516$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 3).

**Tabela 1.** Análise comparativa da proporção global de Tregs e pDCs nas amostras de sangue periférico. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

	<b>BAD</b>	<b>AAD</b>	<b>GC</b>
<b>Treg</b>			
%	0,53 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	0,42 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	0,71 $\pm$ 0,20
% CD4 <sup>+</sup>	5,06 $\pm$ 1,65	4,96 $\pm$ 1,14	5,77 $\pm$ 1,27
Céls/ $\mu$ l	33,95 $\pm$ 11,02 <sup>b</sup>	39,89 $\pm$ 18,73	50,89 $\pm$ 18,17
<b>pDC</b>			
%	6,05 $\times 10^{-2}$ $\pm$ 1,93 $\times 10^{-2}$ <sup>b</sup>	4,07 $\times 10^{-2}$ $\pm$ 1,99 $\times 10^{-2}$ <sup>a,c</sup>	16,62 $\times 10^{-2}$ $\pm$ 4,18 $\times 10^{-2}$
Céls/ $\mu$ l	3,91 $\pm$ 1,41 <sup>b</sup>	3,62 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	12,11 $\pm$ 4,31

% = Percentagem do total células no sangue periférico % CD4<sup>+</sup> = Percentagem de células Treg do total de células CD4<sup>+</sup>; BAD, baixa actividade de doença; AAD, alta actividade de doença; GC, grupo controlo. Atribuída significância estatística para  $p<0,05$  (Mann-Whitney U test): <sup>a</sup>AAD versus GC; <sup>b</sup>BAD versus GC; <sup>c</sup>AAD versus BAD.

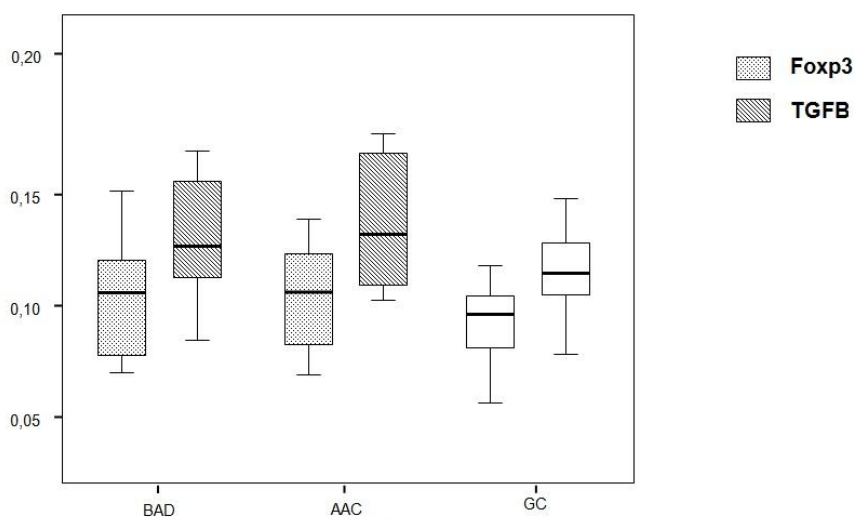
**Figura 1.** Gráfico da expressão génica do IDO e ICOS-L por célula (pDCs) para os grupos de doentes com AR e GC.



BAD, baixa actividade da doença; AAD, alta actividade da doença; GC, grupo controlo.

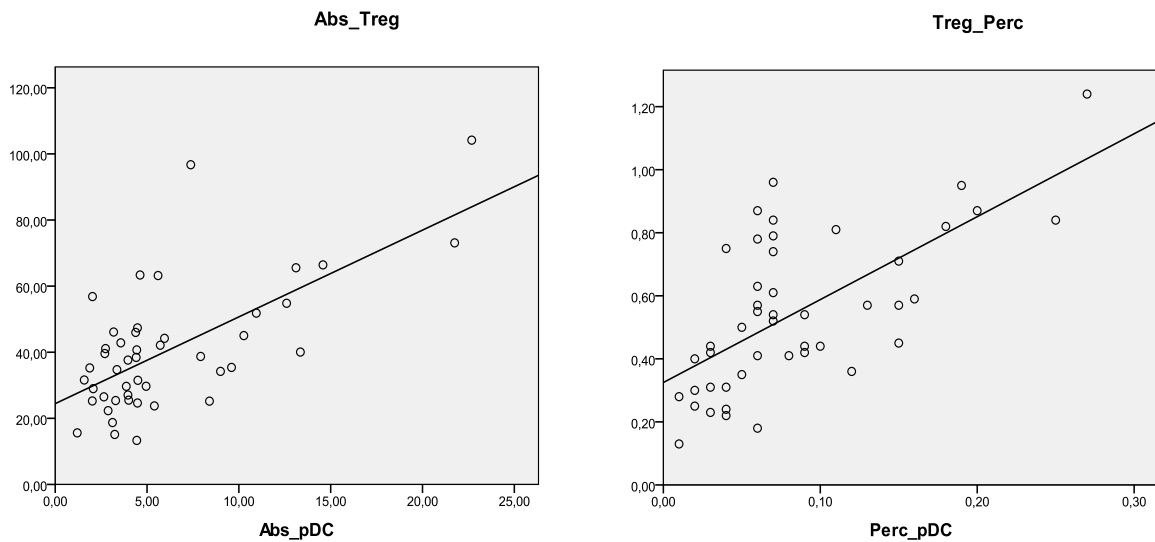
\* Atribuída significância estatística para  $p < 0.05$  quando comparados pacientes com AAD com GC.

**Figura 2.** Gráfico da expressão génica do FoxP3 e TGF- $\beta$ 1 por célula (Treg) para o grupo de doentes com AR e GC.



BAD, baixa actividade da doença; AAC, alta actividade da doença; GC, grupo controlo.

**Figura 3.** Gráfico de correlação entre os valores absolutos de Treg e pDC (esquerda) e entre a frequência relativa de Treg e pDC (direita).



## Discussão

Ao longo dos anos foram realizados diversos estudos com o intuito de clarificar se um desequilíbrio nos níveis de Tregs ou uma desregulação funcional estariam envolvidos no despoletar da AR e/ou na cronicidade da doença. No que diz respeito às pDCs, até agora, ainda menos se sabe acerca da sua função e contribuição na perda espontânea de tolerância.

No presente estudo demonstrámos que os doentes com AR possuem níveis diminuídos de número absoluto e frequência relativa de pDCs circulantes, resultados consistentes com estudos anteriores (23-25).

Este deficit foi mais marcado em doentes com alta actividade de doença, o que apoia a correlação negativa entre níveis circulantes de pDCs e actividade de doença, bem como



sugere um novo elo central de ligação na patogenia da Artrite Reumatóide. De facto, as articulações afectadas contêm grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, bem como APCs e outras células recrutadas em estado activado, capazes de induzir alterações fenotípicas e funcionais em pDCs normais, particularmente em períodos de doença activa, o que poderá resultar em níveis celulares diminuídos no sangue periférico, devido à mobilização destas para o líquido e membrana sinovial (26,27). Apesar dos diversos estudos em artrite, uma grande parte das questões relativas ao papel dos vários subtipos de células dendríticas na quebra da auto-tolerância continuam por esclarecer.

Neste trabalho tentámos avaliar as funções das pDCs no seu *steady state* e na presença de auto-imunidade, de acordo com as contribuições relativas das vias da IDO e ICOS/ICOS-L para a co-estimulação de células T que interagem com pDCs. Verificámos que as pDCs de doentes com alta actividade de doença expressavam níveis significativamente aumentados de mRNA de IDO em comparação com o grupo controlo. Estes achados podem ser parcialmente explicados pelos diferentes mecanismos empregues pelas pDCs na regulação de resposta imune no seu *steady state* e durante o desenvolvimento de auto-imunidade. Assim, no grupo controlo (*steady state*) as pDCs imaturas constitutivamente apresentam antígenos *self* às células T CD8<sup>+</sup> e portanto mantêm a tolerância periférica do sistema imune. Adicionalmente, as pDCs suprimem a actividade das células dendríticas convencionais e mantêm-nas imaturas, em parte envolvendo a produção de IDO. Por seu lado, o desenvolvimento de uma resposta auto-imune pela estimulação simultânea dos TLR (*toll like receptors*) e a exposição a antígenos *self* promovem a maturação das pDCs, com produção de IFN- $\alpha$  e apoio na geração de células T auto-reactivas CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. Na doença de alta actividade, a estimulação prolongada do TLR poderá induzir uma maturação alternativa das pDCs em potentes células apresentadoras de antígenos que estimulam a geração de células T reguladoras (sejam elas CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> ou Tr1, produtoras de IL-10). Neste estágio, e consistente com os nossos

achados, a alta produção de IDO por parte das pDCs também proporciona um potente mecanismo para suprimir as células dendríticas inflamatórias e controlar a resposta auto-imune no líquido e membrana sinovial, servindo como mecanismo de *feedback*. Se estas pDCs de doentes com alta actividade expressam ou não IDO funcionando ou se as células T destes doentes desenvolvem uma resistência às acções inibitórias da IDO funcionando ainda se mantém por explicar.

O nosso estudo não revelou diferenças significativas no mRNA da ICOS-L entre doentes com AR ou em comparação com o GC. Estes achados sugerem que, em doentes com AR, a via ICOS/ICOS-L não parece contribuir para a co-estimulação e processo de diferenciação de células T CD4<sup>+</sup>.

Considerando que as Tregs são uma população especializada envolvida na regulação de respostas efectoras auto-reactivas, apoiando um mecanismo *major* através do qual a tolerância é mantida e a auto-imunidade evitada, também focámos o nosso estudo nesta sub-população e na sua função na AR. Encontrámos níveis significativamente menores de valores absolutos e frequência relativa de Tregs entre doentes com AR e GC, contudo, não identificámos qualquer alteração significativa referente ao mRNA do FoxP3 e TGF- $\beta$  em Tregs purificadas entre esses grupos. Os estudos publicados acerca do número e funcionalidade das Tregs em doentes com AR são contraditórios. Contrariamente aos nossos resultados, vários estudos sugeriram que as Tregs têm um deficit funcional tanto na sinovial articular como no sangue periférico (28-30).

Em conjunto com estudos anteriores, os nossos resultados sugerem a hipótese de que as células T reguladoras serão afectadas pelas citocinas produzidas no micro-ambiente articular, perdendo a sua função reguladora o que conseqüente levará ao recrutamento de mais Tregs do sangue periférico para o órgão alvo, numa tentativa de controlar a inflamação. Por outras palavras, as Tregs circulantes, na ausência de estímulo pró-inflamatório, parecem

exibir ligeiras alterações funcionais, sendo recrutadas activamente, reflectindo um mecanismo compensatório com o objectivo de contrariar o micro-ambiente pró-inflamatório reumatóide.

Os autores reconhecem importantes limitações no presente estudo. A reduzida dimensão da amostra condiciona um reduzido poder estatístico. Embora a Artrite Reumatóide seja uma doença sistémica, ela está localizada em articulações e portanto um estudo exclusivo de sangue periférico pode excluir muitos resultados relevantes para o estudo de células reguladoras neste tipo de doença. O facto de ser um estudo transversal, em que cada doente foi estudado num único ponto no tempo, limita a qualidade da informação recolhida, na medida em que seria importante avaliar a evolução do doente, bem como acompanhar as variações dos níveis das células em questão.

Estudos prospectivos de maiores dimensões, incluindo avaliações sequenciais de sangue periférico e líquido sinovial de articulações afectadas, antes e depois do início da terapêutica com agentes biológicos (anti-TNF e antagonistas da IL-6) são necessários para confirmação e validação dos resultados encontrados.

Em resumo, este estudo demonstra que uma depleção exacerbada das pDCs e Tregs no sangue periférico de doentes com AR pode indicar que estas células apresentam uma actividade supressora normal e poderão ter um papel central na regulação das respostas de células T auto-reactivas e produção de auto-anticorpos no microambiente pró-inflamatório reumatóide.

## Bibliografia

1. Falgarone G, Jaen O, Boissier MC. Role for innate immunity in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2005; 72:17–25.
2. Fournier C. Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 2005; 72:527–32.
3. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151–64.
4. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184:387–96.
5. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998; 160:1212–8.
6. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10:1969–80.
7. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188:287–96.

8. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22:329–41.
9. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by selfreactive T cells. *Nature* 2005; 435:598–604.
10. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001; 27:18–20.
11. Londei M. Role of regulatory T cells in experimental arthritis and implications for clinical use. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:118–20.
12. Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, Smaoui F, Monnet D, Ittah M, Breban M. Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1624–35.
13. Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 2008;181:5396–404.
14. Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J, et al. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2008;118:3431–9.
15. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007;117:2570–82.

16. Bianco NR, Kim SH, Ruffner MA, Robbins PD. Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2,3-dioxygenase–positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models. *Arthritis Rheum* 2009;60:380–9.
17. Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Kroczeck. 1999. ICOS is an inducible T cell costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397: 263–266.
18. Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, S. D. Khare, U. Sarmiento, J. Guo, T. Horan, G. Shih, M. Zhang, M. A. Coccia, T. Kohno, et al. 1999. T cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402: 827–832.
19. Witsch, E. J., M. Peiser, A. Hutloff, K. Buchner, B. G. Dorner, H. Jonuleit, H. W. Mages, and R. A. Kroczeck. 2002. ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on reactivation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32: 2680–2686.
20. 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;31:315–24.
21. Van der Heijde DMFM, van't Hof MA, van Riel PLCM, van der Putte LBA. Development of a disease activity score based on judgement in clinical practice by rheumatologists. *J. Rheumatol* 1993; 20:579-81.
22. J Vandesompele, K De Preter, F Pattyn, B Poppe, N Van Roy, A De Paepe, F Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (2002).
23. Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, McInnes IB: Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006, **8**:R15].

24. Lande R, Giacomini E, Serafini B, Rosicarelli B, Sebastiani GD, Minisola G, et al. Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2004 Aug 15;173(4):2815-24.
25. Richez C, Schaefferbeke T, Dumoulin C, Dehais J, Moreau JF, Blanco P. Myeloid dendritic cells correlate with clinical response whereas plasmacytoid dendritic cells impact autoantibody development in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):R100.
26. Lande R, Giacomini E, Serafini B, Rosicarelli B, Sebastiani GD, Minisola G, Tarantino U, Riccieri V, Valesini G, Coccia EM. Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J Immunol.* 2004 Aug 15;173(4):2815-24.
27. Cavanagh LL, Boyce A, Smith L, Padmanabha J, Filgueira L, Pietschmann P, Thomas R. Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R230-40. Epub 2005 Jan 11.
28. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25<sup>high</sup> T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008 May-Jun;253(1-2):92-101.
29. Monte K, Wilson C, Shih FF. Increased number and function of FoxP3 regulatory T cells during experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008 Dec;58(12):3730-41.
30. Raghavan S, Cao D, Widhe M, Roth K, Herrath J, Engstrom M, et al. FOXP3 expression in blood, synovial fluid and synovial tissue during inflammatory arthritis and intra-articular corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis.* 2009 Dec;68(12):1908-15.