

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR

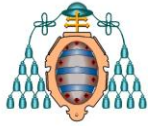
ÁREA DE INMUNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**CÉLULAS T EFECTORAS Y REGULADORAS EN EL LUPUS
ERITEMATOSO SISTÉMICO. EFECTO DE LOS CORTICOIDES SOBRE
LA EXPRESIÓN DE FOXP3 Y LA PRODUCCIÓN DE IL-17**

CATUXA PRADO CUETO

OVIEDO, 2012



RESUMEN (en Inglés)

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder characterized by a broad clinical spectrum in which both effector and regulatory CD4⁺ T lymphocytes play key roles.

Treg adoptive transfer therapy has become an attractive way to treat a broad array of immunological disorders. Thus it is of great importance to provide new protocols for generating or expanding these populations *in vitro* or *in vivo*. Since it is known that glucocorticoids enhance FOXP3 expression, they could be included in these protocols. Results from the present thesis reveal that dexamethasone upregulates FOXP3 expression and generates anergic CD25^{high} cells with phenotypic characteristics comparable to those of nTreg cells but unable to significantly inhibit cellular proliferation. As well, dexamethasone treatment increases FOXP3 levels in Treg cells generated *in vitro* with TGFβ, but again, this expression does not correlate with increased suppressor ability. These results are supported by the fact that CD4⁺CD25^{high} cells from SLE patients under prednisone therapy do not exhibit enhanced suppressive function than those from SLE patients not receiving this treatment.

Taking together, our data support the idea that FOXP3 expression in humans is not an exclusive attribute of Treg cells. Subsequently, the use of FOXP3 as a Treg cell marker must be done cautiously, especially in patients with systemic inflammatory diseases or those under corticoid treatment.

The study of effector CD4⁺ T in SLE patients and healthy controls demonstrates a relevant effect of high/intermediate doses of glucocorticoids on the deviation towards a Th17 response observed in lupus patients. SLEDAI score correlates positively with Th17/Th1 ratio in corticoid treated patients but not in other patient groups.

Although the analysis of clinical characteristics of SLE patients did not reveal significant differences in Th17 cells or Th17/Th1 index, presence of autoantibodies against ENA seemed to be associated with Th17 responses, suggesting that anti-ENA positivity could be used as a potential biomarker for Th17 bias, especially in those patients which can be treated with glucocorticoids.

The analysis of IL-6R, IL-12R, STAT3 and STAT4 gene expression suggested that the effect of glucocorticoids on Th17/Th1 index is mediated by their capacity to increase STAT3 and IL-6R expression.

Finally, the analysis of FOXP3⁺ populations in SLE patients showed an increment in CD25⁻ FOXP3⁺ population in SLE associated with CD4⁺ downregulation and disease progression, whereas the increased percentages of CD25^{low} FOXP3⁺ cells seem to be related to the activated status of SLE lymphocytes. Our results suggest that these FOXP3⁺ populations do not display regulatory functions. In view of this data and taking into consideration that FOXP3 expression has been associated with anergy in non-suppressive cells, we hypothesize that CD25⁻FOXP3⁺ is a population of anergic cells that could arise after inflammation or as response to corticoid treatment. Besides, in spite of the normal amount of CD25^{high}FOXP3⁺ cells



(classical Treg cells), the data herein presented evidence on the impairment of Treg function in SLE, since the negative correlations between the number of Treg and Th secreting cells found in healthy subjects were disrupted in patients. Also, our data showed that CD25^{high} cells from active patients tend to secrete more IL-17 and, importantly, present a greatly decreased FOXP3⁺/IL-17⁺ ratio as compared to healthy individuals. These data, together with the positive correlation found between the number of CD25^{high}FOXP3⁺ cells and serum levels of IL-17 in lupus patients, seem to suggest that Treg from SLE patients tend to trans-differentiate into Th17 cells.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y MOLECULAR

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	13
INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 INMUNIDAD MEDIADA POR LINFOCITOS T CD4+	16
1.2 GENERACIÓN DE CÉLULAS T CD4+ EFECTORAS.....	18
1.2.1 Activación.....	18
1.2.2 Diferenciación	22
1.2.3 Función.....	25
1.3 CÉLULAS T CD4+ REGULADORAS	29
1.3.1 Células T reguladoras naturales (nTreg)	30
1.3.1.1 Fenotipo de las células nTreg.....	31
1.3.1.2 Mecanismos funcionales de las células nTreg.....	32
1.3.2 Células T reguladoras inducidas (iTreg)	34
1.4 FOXP3 (FORKHEAD BOX PROTEIN 3).....	37
1.5 PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS	40
1.6 TOLERANCIA INMUNOLÓGICA.....	42
1.6.1 Tolerancia central.....	43
1.6.2 Tolerancia periférica	44
1.7 EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....	45
1.7.1 Etiología.....	45
1.7.2 Epidemiología.....	46
1.7.3 Clínica y diagnóstico	46
1.7.4 Tratamiento	49
1.7.5 Corticoides.....	49
1.7.6 Patogenia.....	52
1.7.7 Implicación de las células T reguladoras y efectoras en la patogenia del LES.....	53
OBJETIVOS.....	59
CAPÍTULO 2 MATERIAL Y MÉTODOS	63
2.1 SUJETOS.....	65
2.1.1 Pacientes.....	65
2.1.2 Controles	65
2.2 MATERIAL Y MÉTODOS	65

2.2.1	Separación de subpoblaciones celulares	65
2.2.1.1	Aislamiento de células mononucleares	65
2.2.1.2	Aislamiento de linfocitos CD4 ⁺ CD25 ⁻	66
2.2.1.3	Aislamiento de linfocitos CD4 ⁺ CD25 ⁺	67
2.2.1.4	Aislamiento de monocitos.....	67
2.2.2	Citometría de flujo.....	68
2.2.2.1	Tinción extracelular.....	68
2.2.2.2	Tinción intracelular	68
2.2.3	Criopreservación.....	71
2.2.4	Cultivos celulares.....	71
2.2.4.1	Generación in vitro de células CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ a partir de linfocitos CD4 ⁺ CD25 ⁻	71
2.2.4.2	Generación de células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC)	73
2.2.4.3	Análisis de la capacidad antiproliferativa.....	74
2.2.5	Análisis de la expresión génica	75
2.2.5.1	Extracción de RNA mensajero	75
2.2.5.2	Síntesis de cDNA.....	76
2.2.5.3	RT-PCR.....	76
2.2.6	Cuantificación de citocinas	77
2.2.6.1	ELISA.....	77
2.2.6.2	Cytometric Bead Array.....	77
2.2.7	Análisis estadístico.....	78

CAPÍTULO 3	EFEECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FOXP3 Y LA ACTIVIDAD REGULADORA	81
3.1	INTRODUCCIÓN.....	83
3.2	RESULTADOS.....	84
3.2.1	Expresión de FOXP3 y otros marcadores de células Treg en células CD4 ⁺ CD25 ⁻ tratadas con dexametasona.....	84
3.2.2	La dexametasona incrementa la expresión de FOXP3 en células Treg generadas in vitro con TGFβ.....	86
3.2.3	Efecto de la dexametasona sobre la expresión génica de FOXP3 ..	88
3.2.4	Estudio de la funcionalidad de las células generadas con dexametasona.....	89

3.2.5	Efecto del tratamiento con glucocorticoides en la funcionalidad de las células CD4 ⁺ CD25 ^{high} de pacientes de LES	92
3.3	DISCUSIÓN	93
CAPÍTULO 4	BALANCE TH17/TH1 EN EL LES. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES ...	99
4.1	INTRODUCCIÓN	101
4.2	RESULTADOS	102
4.2.1	Efecto de los corticoides sobre las células Th17 y Th1 en pacientes de LES	102
4.2.2	Asociación entre la presencia de autoanticuerpos y la respuesta Th17	106
4.2.3	Efecto de los glucocorticoides en la expresión de STAT3 e IL-6R en los pacientes de LES	108
4.3	DISCUSIÓN	110
CAPÍTULO 5	ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES CD4⁺FOXP3⁺ EN EL LES	113
5.1	INTRODUCCIÓN	115
5.2	RESULTADOS	117
5.2.1	Expresión de FOXP3 ⁺ en el LES	117
5.2.2	Células Th productoras de citocinas en el LES y su relación con FOXP3	122
5.2.3	Relación entre los niveles séricos de citocinas y las células CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	125
5.3	DISCUSIÓN	127
CAPÍTULO 6	133
	DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS	135
	CONCLUSIONS	145
	BIBLIOGRAFÍA	149
	RESUMEN	181
	SUMMARY	187

ANEXO I. Artículos científicos derivados de la tesis

Artículo 1. Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. Prado C, Gómez J, López P, de Paz B, Gutiérrez C, Suárez A. Immunobiology. 2011 Mar; 216(3):386-92. Epub 2010 Jul 27

Artículo 2. Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients. Prado C, de Paz B, Gómez J, López P, Rodríguez-Carrio J, Suárez A. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Oct; 50(10):1794-801. Epub 2011 Jul 12

Artículo 3. Relationship between FOXP3 positive populations and cytokine production in systemic lupus erythematosus. Prado C, de Paz B, Gómez J, López P, Rodríguez-Carrio J, Suárez A. Enviado a *Cytokine*

ANEXO II. Otros artículos científicos relacionados con el tema de la tesis.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estímulo y coestímulo en la activación de los linfocitos T CD4+	20
Figura 1.2. Diferenciación de las células T CD4+ efectoras.....	26
Figura 1.3. Caracterización de las células reguladoras naturales mediante citometría de flujo, según la expresión de CD25 y CD127	32
Figura 1.4. Principales poblaciones de células T CD4+ efectoras y reguladoras.....	34
Figura 1.5. Defectos en los mecanismos de eliminación de células apoptóticas e inmunocomplejos en la patogénesis del LES	54
Figura 2.1. Explicación esquemática del tratamiento seguido por las células CD4+CD25-.....	73
Figura 3.1. Expresión de marcadores de células Treg en células tras 24 horas en presencia/ausencia de dexametasona	85
Figura 3.2. Efecto de la dexametasona sobre las células CD4+CD25- activadas y expandidas durante 2 semanas.....	87
Figura 3.3. Expresión de FOXP3 en células nTreg y células Treg generadas in vitro con TGFβ1.....	88
Figura 3.4. Efecto de la dexametasona sobre la expresión génica de FOXP3	89
Figura 3.5. Capacidad supresora de las células CD25+-Control, CD25+-Dex, TGFβ Treg y TGFβ-Dex Treg.....	91
Figura 3.6. Expresión de FOXP3, inhibición de la proliferación y capacidad proliferativa de las células CD25+-Control, CD25+-Dex, TGFβ Treg, TGFβ-Dex Treg, nTreg y CD4+CD25-	92
Figura 3.7. Función supresora de las células nTreg de pacientes de LES	93
Figura 4.1. Expresión de IL-17 e IFNγ frente a CD45RO en un individuo sano y un paciente de LES	104
Figura 4.2. Células Th1 y Th17 en pacientes de LES y controles sanos	105
Figura 4.3. Efecto de los glucocorticoides y de la actividad de la enfermedad en las subpoblaciones Th17 y Th1	106
Figura 4.4. Respuesta Th17 en pacientes anti-ENA+.....	107
Figura 4.5. Efecto de los glucocorticoides sobre la expresión génica de STAT3 y de IL-6R en los pacientes de LES.....	109
Figura 5.1. Expresión de FOXP3 y CD127 en las subpoblaciones CD25-, CD25 ^{low} y CD25 ^{high}	118
Figura 5.2. Asociación de las subpoblaciones CD25-FOXP3+ y CD25 ^{low} FOXP3+ con la duración de la enfermedad.....	121

Figura 5.3. Células Th productoras de citocinas en controles y pacientes....	123
Figura 5.4. Correlaciones entre las células CD25 ^{high} FOXP3 ⁺ y las células productoras de citocinas	124
Figura 5.5. Ratios IL-17 ⁺ /FOXP3 ⁺ , IL-17 ⁺ /TNFα ⁺ , IL-17 ⁺ /IFNγ ⁺ e IL-17 ⁺ /IL-10 ⁺ en las células CD25 ^{high} de controles y pacientes de LES según la actividad de la enfermedad.....	125
Figura 5.6. Asociación entre las células CD25 ^{high} FOXP3 ⁺ y las citocinas séricas relacionadas con la respuesta Th17	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Criterios de la ACR para el diagnóstico del LES.....	48
Tabla 1.2. Principales autoanticuerpos en el LES	53
Tabla 2.1. Anticuerpos utilizados para la detección de marcadores celulares de superficie mediante citometría de flujo.....	70
Tabla 2.2. Anticuerpos utilizados para la detección de marcadores intracelulares mediante citometría de flujo	71
Tabla 2.3. Anticuerpos utilizados para la detección de citocinas mediante citometría de flujo.....	71
Tabla 2.4. Citocinas determinadas en suero mediante Flex Set Cytometric Bead Arrays	78
Tabla 4.1. Características de los pacientes de LES clasificados según el tratamiento.....	103
Tabla 5.1. Características de los pacientes de LES.....	119
Tabla 5.2. Subpoblaciones CD4 ⁺ en controles sanos y pacientes de LES.....	120

ABREVIATURAS

ACR: *American College of Rheumatology* (Colegio Americano de Reumatología)

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

ANA: *antinuclear antibodies* (anticuerpos antinucleares)

APC: *antigen presenting cells* (célula presentadora de antígeno)

CD: *cluster of differentiation* (Clúster de Diferenciación)

cpm: *counts per minute* (cuentas por minuto)

CTLA-4: *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (antígeno 4 del linfocito T citotóxico)

DC: *dendritic cell* (célula dendrítica)

Dex: dexametasona

DNA: ácido desoxirribonucleico

dsDNA: ácido desoxirribonucleico de doble cadena

EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilendiaminotetraacético)

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

ENA: *extractable nuclear antigens* (antígenos nucleares extraíbles)

FCS: *fetal calf serum* (suero bovino fetal)

FITC: *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

FOXP3: *forkhead box protein 3*

GC: glucocorticoides

GITR: *glucocorticoid-induced TNF-related protein* (proteína relacionada con el TNF inducida por glucocorticoides)

GM-CSF: *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)

HLA: *Human Leukocyte Antigens* (Antígenos Leucocitarios Humanos)

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucina

IPEX: *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome* (síndrome de disregulación inmune, poliendocrinopatía y enteropatía ligado al cromosoma X)

IR: *interquartil range* (amplitud intercuartil)

IRF: *interferon regulatory factor* (factor regulador del interferon)

iTreg: *induced regulatory T cells* (células T reguladoras inducidas)

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

MACS: *magnetic-activated cell sorting* (separación celular por activación magnética)

MDDC: *monocyte derived dendritic cells* (células dendríticas derivadas de monocitos)

MNC: *mononuclear cells* (células mononucleares)

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NK: *natural killer cells* (células "asesinas" naturales)

nTreg: *natural regulatory T cells* (células T reguladoras naturales)

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (solución salina tamponada con fosfato)

PE: *phycoerythrin* (ficoeritrina)

PerCP: *peridinin chlorophyll protein* (proteína peridin clorofila)

RNP: ribonucleoproteínas

SD: *standard deviation* (desviación estándar)

SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (índice de la actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico)

Sm: antígeno Smith

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

SSA: *Sjögren Syndrome antigen A* (antígeno A del Síndrome de Sjögren)

SSB: *Sjögren Syndrome antigen B* (antígeno B del Síndrome de Sjögren)

STAT: *signal transducers and activators of transcription* (transductores de señal y activadores de la transcripción)

TCR: *T cell receptor* (receptor de células T)

TGF: *transforming growth factor* (factor de crecimiento transformante)

Th: *T helper cells* (células T cooperadoras)

TNF: *tumor necrosis factor* (factor de necrosis tumoral)

Tr1: *regulatory T cells type 1* (células T reguladoras tipo 1)

Treg: *regulatory T cells* (células T reguladoras)

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

Los organismos superiores han desarrollado, a lo largo de la evolución, diferentes estrategias para luchar contra los agentes infecciosos. Estos mecanismos, que forman en su conjunto el sistema inmune, resultan imprescindibles para la supervivencia del individuo y la especie. El sistema inmune es capaz de proteger al huésped mediante una gran variedad de armas defensivas, que se pueden clasificar como pertenecientes a la inmunidad innata o a la inmunidad adaptativa.

Si un agente patógeno logra atravesar las barreras físicas de la piel y mucosas se encontrará con la primera línea de defensa, la inmunidad innata, que incluye un gran número de células y de factores solubles que inactivan o matan a los invasores. Entre las células de la inmunidad innata se incluyen los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), macrófagos, células dendríticas (DC) y células *natural killer* (NK). Las células del sistema inmune innato detectan a los invasores potencialmente dañinos mediante receptores (PRRs) que reconocen patrones moleculares expresados en la mayoría de los patógenos (PAMPs). El reconocimiento del patógeno por parte de las células del sistema innato resulta en la fagocitosis del mismo o en la liberación de moléculas citotóxicas que matan al microorganismo o la célula infectada. La respuesta inmune innata tiene un gran poder destructivo y generalmente logra la eliminación del agente patógeno invasor; sin embargo, carece de especificidad y tampoco recuerda un encuentro previo con el antígeno.

La especificidad y la memoria son propiedades de la inmunidad adaptativa, cuyos agentes principales son los linfocitos (linfocitos B, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺). El sistema de la inmunidad adaptativa recibe la información generada por la inmunidad innata. Algunas células del sistema inmune innato han desarrollado mecanismos que las capacitan para cooperar con los linfocitos T en el reconocimiento del antígeno. Estas células sintetizan y expresan en membrana moléculas del

complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en las cuáles presentan péptidos derivados de los antígenos: son las células presentadoras de antígenos (APC). Los antígenos endógenos son procesados en el proteosoma y transportados al retículo endoplasmático, donde los péptidos son cargados en moléculas MHC de clase I. Los complejos péptido-MHC I son transportados a la superficie de las APC para estimular a las células T que expresan el co-receptor CD8. Los péptidos derivados de antígenos exógenos degradados en compartimentos celulares especializados de las APC se asocian a las moléculas MHC de clase II en vesículas que se unen al sistema endocítico en su camino hacia la superficie celular, donde estimularán a las células T CD4⁺. Las APC no sólo exponen los péptidos derivados de los antígenos, sino que también les ofrecen el coestímulo –unión de CD80/86 a CD28- y segregan citocinas que dictarán, en gran medida, el camino de diferenciación que seguirán los linfocitos T.

1.1 INMUNIDAD MEDIADA POR LINFOCITOS T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ constituyen una población heterogénea de células que juegan un papel esencial en la inmunidad adaptativa. Tras el encuentro de las células T CD4⁺ vírgenes con el antígeno en los órganos linfoides periféricos, éstas se activan y proliferan para dar lugar a una población de linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicos, algunos de los cuales se diferenciarán en células efectoras. Conforme el antígeno es eliminado, muchas de las células T activadas son inducidas a entrar en apoptosis mientras que otras se diferencian en células de memoria – células de vida media larga con capacidad para responder mucho más rápidamente a una nueva infección por parte del mismo patógeno–.

Los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en diferentes subpoblaciones de células efectoras (linfocitos T CD4⁺ helper, Th) encargadas de la protección frente a patógenos, y en células T reguladoras (Treg), que controlan tanto las respuestas efectoras frente

a los autoantígenos como las respuestas frente a antígenos extraños. El término *helper* proviene de las primeras observaciones realizadas al estudiar estas poblaciones, en las que se comprobó la participación de algunas de estas células en la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B (inmunidad humoral). Otra subpoblación de células T CD4⁺ se encontró relacionada con la inmunidad mediada por células o hipersensibilidad retardada, caracterizada por la inducción de reacciones inflamatorias fundamentalmente mediante la activación de macrófagos. La primera demostración de la existencia de, al menos, dos subpoblaciones de células T CD4⁺ efectoras provino de los experimentos desarrollados por Parish y Liew (1), en los cuales se demostraba una relación inversa entre la respuesta humoral y la respuesta inmune mediada por células. Pocos años después Tim Mossman y Robert F. Coffman demostraron que las células T CD4⁺ podían ser clasificadas según el patrón de citocinas que produjeran (2). Los linfocitos T CD4⁺ fueron clasificados en dos subpoblaciones: aquellos que secretaban mayoritariamente IFN γ fueron designados Th1 mientras que aquellos que producían IL-4 se denominaron Th2. Durante muchos años la heterogeneidad de los linfocitos Th CD4⁺ se limitó a estas dos subpoblaciones, que eran consideradas no sólo las responsables de diferentes tipos de respuestas inmunes protectoras, sino también de la patogénesis de muchos desórdenes inmunológicos.

Por otro lado, desde los años 70 existían numerosas evidencias de la existencia de otra subpoblación de linfocitos con capacidad para suprimir las respuestas inmunes, que fueron denominados inicialmente linfocitos T supresores (3). Desafortunadamente, el interés en esta población fue decayendo en los años siguientes, dada la ausencia de marcadores específicos que permitieran diferenciar las células T supresoras de otras poblaciones de linfocitos, la dificultad para conseguir células T supresoras antígeno-específicas y la incapacidad para encontrar enfermedades en las cuales las anomalías en las células

T supresoras fueran la causa originaria. No fue hasta mediados de los años 90, con los experimentos desarrollados por Sakaguchi et al. (4) que las células T supresoras, ahora rebautizadas reguladoras, volvieron a ser el centro de atención de los inmunólogos.

Sin embargo, fue el descubrimiento de una subpoblación de células productoras de IL-17 el que precipitó la revisión del paradigma Th1/Th2. Aunque la capacidad de las células T CD4⁺ activadas para producir IL-17 era conocida desde hacía muchos años, no fue hasta comienzo de la pasada década que se reconoció la existencia de una subpoblación CD4⁺ helper específica y distinta con capacidad para producir IL-17, que fue denominada Th17.

1.2 GENERACIÓN DE CÉLULAS T CD4⁺ EFECTORAS

1.2.1 Activación

Para que se inicie la respuesta inmune específica se requiere el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos y la subsiguiente activación de los mismos. La activación de los linfocitos T CD4⁺ se produce tras el reconocimiento por parte del complejo TCR/CD3 del péptido presentado en el seno de las moléculas MHC de clase II. Sin embargo, la unión del antígeno con el TCR no es suficiente para dar lugar a una respuesta inmune eficaz, si no que es necesaria también la participación de moléculas accesorias que se expresan en la superficie del linfocito CD4⁺ (coestímulo), que favorecen el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. Las principales moléculas implicadas en la interacción entre las células T CD4⁺ y la APC son CD4, CD2, CD45 y CD28 (expresadas en el linfocito T CD4⁺) y sus ligandos respectivos (MHC-II, ICAM-1 y LFA-3 entre otros), que se expresan en la APC. Estas moléculas no sólo están involucradas en la adhesión del linfocito T CD4⁺ y la APC, sino que juegan un importante papel en la transducción de señales y activación de la célula T.

Los linfocitos T CD4⁺ vírgenes necesitan de la presencia de 2 señales distintas para activarse, proliferar y convertirse en células efectoras (Fig. 1.1). La primera señal la proporciona la unión del complejo péptido-MHC II al TCR, junto con la presencia del co-receptor CD4. Esta señal se potencia mediante la molécula de adhesión CD2, cuyos ligandos naturales son CD58 (LFA-3) y CD54 (ICAM-1) expresados en la superficie de las APC. La segunda señal (el coestímulo) la suministra fundamentalmente CD28, que permite la activación celular completa. De hecho, la estimulación a través del TCR en ausencia de co-estímulo conduce al linfocito T a un estado de anergia o incluso a la muerte celular. Los ligandos naturales de CD28 pertenecen a la familia B7 (CD80 y CD86). La segunda señal procedente de CD28 puede ser negativamente regulada por la molécula CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*).

La activación de los linfocitos T CD4⁺ inicia la producción de una serie de eventos bioquímicos que conducen a la expresión de determinados genes y a la adquisición de funciones efectoras. Para ello se requiere un complejo sistema de transmisión de señales de activación a través de los cuáles los estímulos externos son procesados y enviados al núcleo, en un proceso que requiere la formación o activación de segundos mensajeros. En la activación de los segundos mensajeros intervienen señales que proceden del complejo CD3/TCR así como de las moléculas accesorias y de los receptores de citocinas.

Estos eventos se inician tras la interacción antígeno-TCR con la fosforilación de residuos de tirosina de las cadenas intracitoplasmáticas de CD3, concretamente en las regiones ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*), proceso al que contribuye la asociación física de CD4 con el complejo CD3/TCR. Una vez que los ITAM son fosforilados se convierten en sitios a los que se pueden unir determinadas proteínas citoplasmáticas con dominios SH2, entre las que cabe destacar la proteína adaptadora ZAP-70. La unión de ZAP-70 a

estos dominios produce su activación y el inicio de la cascada de señales intracitoplasmáticas.

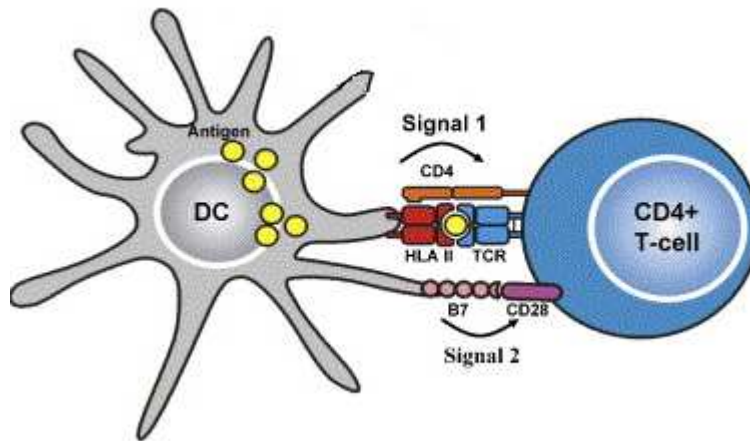


Figura 1.1 El estímulo y coestímulo son necesarios para la activación de los linfocitos T CD4+.

ZAP-70 funciona, por tanto, acoplando las señales que se producen en la superficie con el interior celular. La cascada iniciada por ZAP-70 incluye la fosforilación de la fosfolipasa C, la cual induce la hidrólisis de su sustrato específico, el fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), generándose los metabolitos inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a un receptor específico localizado en el retículo endoplásmico donde facilita la liberación del calcio intracelular de sus compartimentos que estimula el sistema calmodulina/calcineurina. El otro metabolito de la hidrólisis del PIP₂, el DAG, es el principal responsable de la activación de las enzimas proteín kinasas C (PKC). Las PKCs regulan la activación de genes de células T mediante el control de varios factores de transcripción, muchos de los cuáles están ya presentes en las células. Una vez activados se unen a determinadas regiones presentes en los promotores de los genes involucrados en los procesos de proliferación, diferenciación y adquisición de funciones en los linfocitos T, permitiendo su transcripción o reprimiéndola. La expresión de algunos de estos factores de transcripción está restringida

a determinados tipos celulares, como es el caso de NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cells*), mientras que otros, como AP-1 (*Activator Protein 1*) y NF- κ B (*Nuclear Factor kappa β*), están expresados en un gran número de tipos celulares. La mayor parte de los genes involucrados en la activación, diferenciación y proliferación de las células T CD4⁺ poseen sitios de unión para estos factores de transcripción. Este es el caso de muchas de las citocinas que serán producidas por los linfocitos T CD4⁺ activados, y también de otras proteínas involucradas en las funciones efectoras de estas células. Por ejemplo, NF- κ B participa en la transcripción de IL-2, TNF- α , IL-1, ICAM-1, genes de HLA clase I y II y la cadena β del TCR (5). Este factor de transcripción está formado generalmente por complejos de p50 y p65 (p50/p50 y p50/p65), aunque pueden participar otras proteínas como p52, RelB, y c-rel. En reposo, NF- κ B se encuentra retenido en el citoplasma por moléculas inhibitoras de NF- κ B (I κ B). La activación de linfocitos T vía TCR/CD3 induce una cascada de señales que finaliza con la degradación de I κ B que ocasiona la liberación de NF- κ B/rel y su translocación al núcleo.

AP-1, por su parte, es un factor de transcripción formado por proteínas pertenecientes a las familias Jun, Fos o ATF capaces de unirse a una secuencia consenso del DNA y regular la transcripción de un gran número de genes de citocinas proinflamatorias. Las señales transmitidas tras la activación del TCR provocan la transcripción de los genes que codifican para Fos y Jun, aumentando su presencia en el núcleo. Posteriormente estos factores de transcripción se fosforilan, activan y dimerizan, tras lo cual se unen a regiones específicas de los promotores de genes que participan en la respuesta inmune. NFAT se controla por la activación de calcineurina y, por tanto, su inducción requiere la señalización por calcio. NFAT regula la expresión de citocinas como la IL-4, TNF α y GM-CSF y de algunas moléculas de superficie como FasL y CD40L (6). La activación del TCR ocasiona la

fosforilación de la calcineurina, que es capaz de defosforilar a NFAT (altamente fosforilado en células T en reposo), lo que permite la translocación de NFAT al núcleo y el aumento de afinidad para unirse al DNA. NFAT necesita la cooperación de AP-1 para activar la transcripción de la mayor parte de sus genes diana, por lo que las rutas de señalización de AP-1 y NFAT convergen en la mayoría de los casos (6).

1.2.2 Diferenciación

Una vez que el linfocito T CD4⁺ virgen se ha activado, esto es, ha recibido el estímulo (MCH II-péptido-TCR) y co-estímulo (CD80/86-CD28) puede diferenciarse hacia, al menos, 3 tipos diferentes de linfocitos T CD4⁺ efectoras -Th1, Th2 y Th17- y otros tantos tipos de células reguladoras -iTreg, Tr1 y Th3-. El proceso de diferenciación hacia uno u otro linaje viene determinado, fundamentalmente, por la presencia de determinadas citocinas en el medio, citocinas producidas por las APC o por otras células que no necesariamente tienen que pertenecer al sistema inmune. Las citocinas ejercen sus acciones biológicas mediante la unión a su receptor. La mayor parte de los receptores de citocinas están formados, al menos, por una cadena específica que se une a la citocina y otra que se encarga de transducir las señales al interior de la célula y que es compartida por otros receptores de citocinas (cadena común). Los receptores de citocinas se pueden clasificar, según su estructura, en 4 familias: familia de las inmunoglobulinas, familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), familia de los receptores de citocinas y familia de los receptores de quimiocinas. Todos los receptores de la superfamilia de las citocinas, junto con algunos representantes de otras familias, se asocian con moléculas Janus kinasas (Jak). Tras la unión de la citocina se produce la oligomerización del receptor, primer evento necesario para la transducción de la señal al interior de la célula, que produce la subsecuente fosforilación cruzada de las proteínas Jak. Una vez

activadas, las Jak son capaces de fosforilar residuos de tirosina presentes en el propio receptor y en los factores de transcripción STAT. Los STATs fosforilados forman homo o heterodímeros que se transportan al núcleo, donde se unen a secuencias determinadas en los promotores de los genes.

Las diferentes citocinas emplean vías de señalización intracelular diferentes. Se han podido definir distintos patrones de asociación entre los receptores de citocinas, las proteínas Jak y las moléculas STAT. Se han identificado varios miembros de la familia STAT: STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4, STAT 5a, STAT 5b y STAT 6. Aunque un STAT puede ser activado por múltiples receptores y la unión de una citocina a su receptor puede activar varios STATs, aún pueden definirse determinadas relaciones entre receptores y estos factores de transcripción. Esto ha hecho que los diferentes STATs hayan sido relacionados también con la diferenciación hacia los distintos linajes *helper*.

Las moléculas STATs activadas son capaces de inducir la expresión de los factores de transcripción maestros que determinan cada uno de los linajes *helper*. Sin embargo, la inducción de estos factores no ocurre en ausencia de la señalización a través del TCR, lo cual indica que los factores de transcripción activados por el TCR –NFAT, NF- κ B y AP-1– juegan también un papel clave en la regulación de la expresión de los genes maestros. Por tanto, la actuación conjunta de NF-AT, NF- κ B y AP-1 activados tras la estimulación del TCR y las proteínas STATs activadas por diferentes citocinas juegan un papel clave en la inducción de la expresión de los factores de transcripción claves de cada uno de los linajes *helper*: T-bet (Th1), GATA3 (Th2) y ROR γ t (Th17). Las proteínas STAT también colaboran con estos factores de transcripción maestros, con NF-AT, NF- κ B y AP-1 y con otros para inducir, a su vez, la producción de citocinas típicas de cada una de las subpoblaciones de células T CD4⁺, que determinarán, en gran medida, sus funciones

efectoras. En conjunto, la acción de todos estos factores de transcripción constituye un mecanismo complejo que controla la diferenciación de las células T CD4⁺.

La generación de células Th1 depende de la señalización de la IL-12 mediante STAT4, la cual induce la expresión del factor de transcripción T-bet (7). Las células Th1 producen típicamente IFN γ , citocina que es, a su vez, capaz de incrementar la expresión de Tbet, pero en este caso mediante la activación de STAT1. De esta forma la cascada IFN γ -STAT1-T-bet-IFN γ funciona como un mecanismo de amplificación de la diferenciación hacia Th1.

Para la diferenciación hacia Th2 parece ser necesaria la actuación sinérgica de varias citocinas. La activación de STAT6 mediante IL-4, junto con la activación del TCR, induce la expresión de GATA3, el factor de transcripción clave en la generación de células Th2 (8). GATA3 parece ser capaz de inducir su propia transcripción cuando alcanza determinados niveles de expresión (9). GATA3 se une a los loci *IL-4* e *IL-13*, donde puede regular la producción de estas citocinas típicas de las células Th2.

STAT3 es el transductor mediante el cual señalizan la mayor parte de las citocinas involucradas en la generación de las células Th17, como IL-6 (10), IL-21 (11) e IL-23 (12). La estimulación a través del TCR en presencia de TGF- β e IL-6 o IL-21 incrementa la expresión de ROR γ t, el factor de transcripción clave en la generación de células Th17 (13) que producen característicamente IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (14). STAT3 se une directamente a *RORC* e induce la expresión de ROR γ t, aunque la estimulación a través de TCR es también necesaria para la generación de las células Th17. De hecho, los factores de transcripción BATF (un miembro de la familia de AP-1) y Runx1 son necesarios para la inducir la expresión de ROR γ t.

1.2.3 Función

La existencia de diferentes subpoblaciones de células T CD4⁺ efectoras permite el desarrollo de una respuesta inmune adecuada y efectiva según la naturaleza del microorganismo causante de la infección (Fig. 1.2).

Th1. Las células Th1 constituyen una de las primeras subpoblaciones Th descubiertas. Estas células se encargan de la defensa frente a infecciones producidas por patógenos intracelulares, promoviendo la inmunidad mediada por células. Producen fundamentalmente IFN γ , pero también TNF- α y TNF- β , citocinas que actúan estimulando las respuestas inmunes innatas y las mediadas por células T. El IFN γ producido por las células Th1 actúa sobre los macrófagos estimulando la fagocitosis y la destrucción de los microbios en los fagolisosomas. También estimula la producción de inmunoglobulinas que opsonizan a los patógenos facilitando así su eliminación por fagocitosis. Además de ser la citocina efectora clave de las células Th1, el IFN γ parece jugar un papel clave en la propia diferenciación hacia Th1. El IFN γ , junto con la IL-12, es un potente inductor de la expresión de T-bet, el factor de transcripción clave de las células Th1. Además de sus acciones mediante el IFN γ , los linfocitos Th1 activados expresan CD40L en su superficie que, tras unirse a CD40 presente en el macrófago, proporcionan una señal de activación necesaria para estas células fagocíticas y presentadoras de antígeno.

La respuesta Th1 excesiva se ha asociado con respuestas inflamatorias no deseadas, daño tisular e hipersensibilidad retardada. Las células Th1 también se han relacionado con el desarrollo de autoinmunidad, aunque como se verá más adelante, su papel en los desórdenes autoinmunes ha sido revisado en los últimos años.

Th2. Las células Th2 fueron identificadas al mismo tiempo que las células Th1. Esta subpoblación celular se encarga de la defensa frente a patógenos extracelulares, especialmente infecciones producidas por

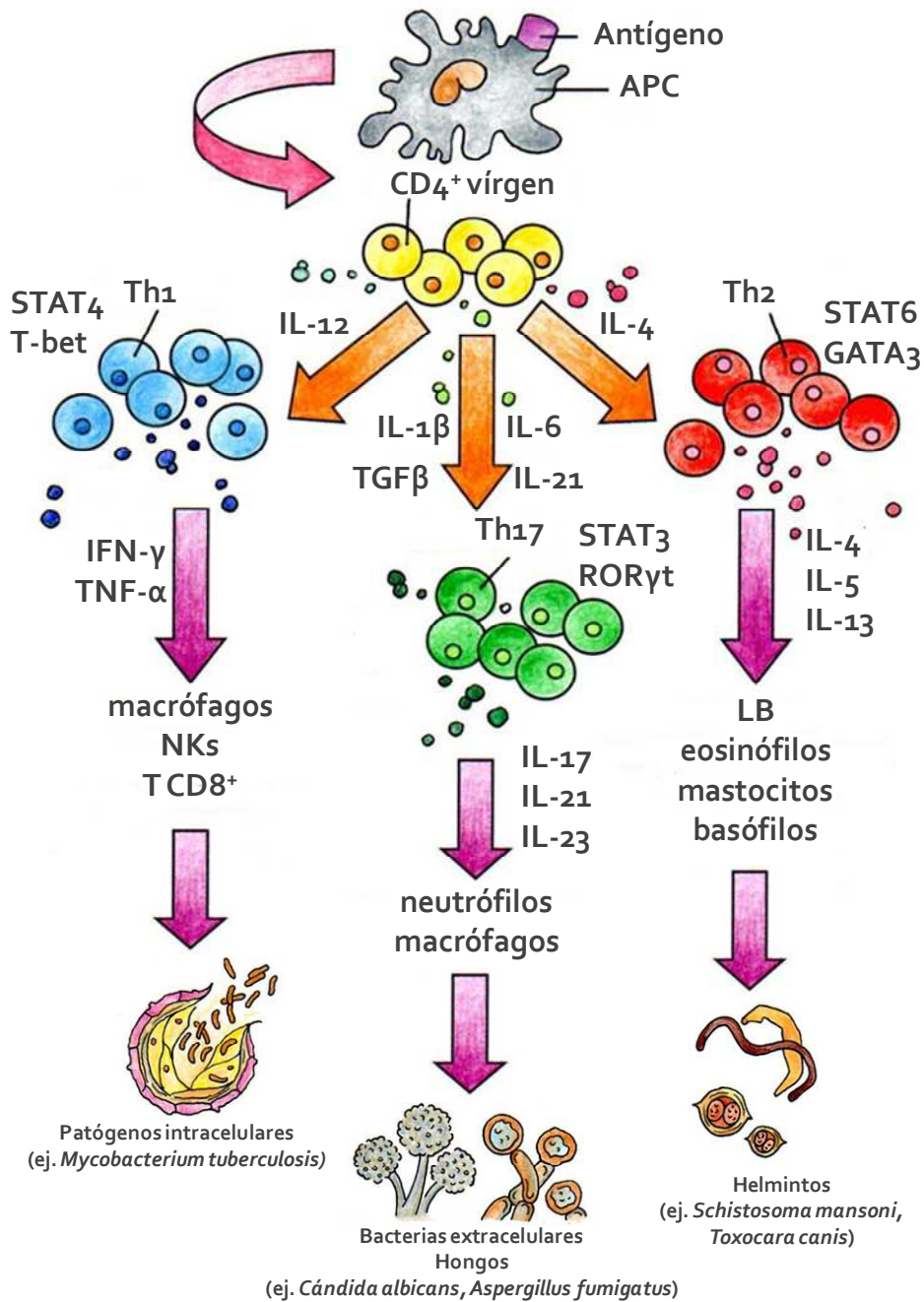


Figura 1.2 Diferenciación de las células T CD4+ efectoras. El ambiente de citocinas en el que se produce el encuentro con el antígeno determina la diferenciación hacia uno u otro linaje y, por tanto, el tipo de respuesta que se genera.

helminthos y artrópodos y realiza sus funciones mediante la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, fundamentalmente. Estas citocinas actúan como factores de crecimiento y activación de linfocitos B, eosinófilos y mastocitos. Los clones Th2 normalmente no presentan actividad citolítica e inducen la síntesis de IgG, IgM, IgE e IgA por parte de los linfocitos B en presencia del antígeno específico. La IgE producida por los linfocitos B en respuesta a la IL-4 actúa sobre los mastocitos, favoreciendo su degranulación. La IL-5 actúa sobre los eosinófilos, células necesarias para luchar contra las infecciones helmínticas. Los anticuerpos que se generan en respuesta a las citocinas Th2 no inducen la activación de la fagocitosis por parte de los macrófagos, si no que, por el contrario, tienden a inhibir estas funciones, razón por la que una respuesta Th2 excesiva se asocia con la inhibición de la inmunidad mediada por células, ocasionado en muchos casos incapacidad para eliminar patógenos intracelulares.

La respuesta Th2 aberrante se asocia con la atopía y el desarrollo de reacciones alérgicas y también con enfermedades autoinmunes en las que la respuesta inmune humoral parece estar incrementada, como el caso del Lupus Eritematoso Sistémico.

TH17. Aunque la función de este linaje helper aún no ha sido completamente clarificada, existen muchas evidencias de que las células Th17 están involucradas en la lucha frente a patógenos extracelulares que no pueden ser eliminados eficazmente por la inmunidad de tipo Th1 y Th2, fundamentalmente en las mucosas (15). Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-17E (IL-25), IL-21 e IL-23. Tanto la IL-17A como la IL-17-F ejercen funciones pro-inflamatorias y actúan sobre una amplia variedad de células, induciendo la expresión de otras citocinas como la IL-6, IL-8, GM-CSF e G-CSF (16, 17), quimiocinas (CXCL1, CXCL10) (18) y metaloproteinasas. Muchos de estos factores, incluidos la IL-17A, IL-17F, IL-8 y GM-CSF inducen el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos. El

análisis de la función de la IL-17 ha sugerido que esta citocina se encarga de la protección del huésped frente a bacterias gram-negativas e infecciones fúngicas, ya que la producción de IL-17 y el reclutamiento de neutrófilos son necesarios para la protección frente a estos patógenos. Algunas evidencias que demuestran esta afirmación provienen de los estudios de ratones knockout para el receptor de la IL-17, que son altamente susceptibles a la infección por *Klebsiella* y *Cándida* (15, 16). Además, la infección con estos patógenos induce la producción preferente de IL-17 (19), sugiriendo que la respuesta Th17 es necesaria para la lucha contra estos microorganismos. Aunque inicialmente se consideraba que todas las células Th17 se generaban en periferia, un trabajo reciente ha demostrado la existencia de células Th17 naturales, las cuales adquieren sus funciones efectoras durante el desarrollo en el timo (20).

Numerosos estudios han encontrado que las células Th17 están involucradas en el desarrollo de la autoinmunidad, especialmente tras el descubrimiento del hecho de que tanto la IL-12 como su receptor compartían una de sus subunidades con la IL-23 y su receptor (discutido en la sección 1.7.7).

En los últimos años se han descrito otras dos poblaciones más de células T CD4⁺ efectoras, denominadas Th9 y Th22, si bien su papel patofisiológico aún no ha sido aclarado.

TH9. La activación del TCR en presencia de TGFβ y IL-4 induce la generación de células Th9, caracterizadas por la producción de IL-9. Esta citocina había sido inicialmente descrita como una citocina de tipo Th2. Sin embargo, cuando las células T CD4⁺ murinas se cultivaban en presencia de TGFβ e IL-4 no eran capaces de producir IL-4, IL-5 o IL-13, si no que secretaban grandes cantidades de IL-9 e IL-10 (21, 22) y eran capaces de inducir colitis y neuritis periférica en ratones (21). Más recientemente se ha descubierto que las células Th17 son capaces de

producir IL-9, sugiriéndose que la IL-9 sinergiza con el TGF β en la diferenciación hacia células Th17. De hecho, la neutralización de la IL-9 atenúa la encefalitis autoinmune experimental (EAE), efecto que se correlaciona con la disminución del número de células Th17 en el sistema nervioso central (23). Curiosamente, la IL-9 también parece estar involucrada en la funcionalidad de las células Treg ya que es capaz de incrementar la funcionalidad de las células CD4⁺FOXP3⁺ in vitro (24).

Th22. La IL-22 es una citocina que se había asociado al linaje de células Th17, pero en el año 2009 dos grupos de investigación independientes demostraron la existencia de una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ capaces de producir IL-22 pero no IL-17 o IFN γ , que fueron denominados Th22 (25, 26). La diferenciación de las células productoras de IL-22 se puede lograr con IL-6 y TNF α , o bien en presencia de células dendríticas plasmacitoides. El descubrimiento de que las células Th22 co-expresan los receptores de migración a piel CCR6 y CCR10 ha sugerido que podrían estar involucradas en la homeostasis y patología de la piel.

1.3 CÉLULAS T CD4⁺ REGULADORAS

Las células reguladoras son los principales actores de la tolerancia periférica. Las primeras indicaciones de la existencia de una subpoblación de células reguladoras provino de los experimentos realizados por Nishizuka y Sakakura a finales de los años 60 (27), en los que ratones recién nacidos timectomizados eran rescatados del desarrollo de lesiones cutáneas mediadas por células T mediante la transferencia de esplenocitos procedentes de ratones adultos. En 1995 Sakaguchi et al. (4) demostraron que las células CD4⁺ procedentes del timo que expresaban altos niveles de la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25) eran los causantes de la mejoría, debido a su capacidad para inhibir la proliferación de linfocitos T efectores.

Se han descrito diferentes tipos de células T CD4⁺ reguladoras, que difieren fundamentalmente en su origen y en la forma en la que ejercen su actividad supresora. De una forma general las células reguladoras pueden clasificarse, según su origen, en *células reguladoras naturales (nTreg)* y *células reguladoras inducidas (iTreg)*.

1.3.1 Células T reguladoras naturales (nTreg)

Las células nTreg se originan en el timo, donde adquieren sus características fenotípicas y funcionales. Una característica de esta población celular es la habilidad para reconocer auto-antígenos. El proceso mediante el cual los timocitos autoreactivos son seleccionados para convertirse en células reguladoras no es aún del todo conocido, aunque se sabe que la activación intensa a través del TCR es imprescindible para la generación de células nTreg (28). Ésta ocasiona la expresión de FOXP3, el factor de transcripción clave en el desarrollo y función de las células Treg (29, 30), el cual, a su vez, se encarga de aumentar la expresión de moléculas clave en la supervivencia celular (31).

El estudio del repertorio de TCR de los linfocitos nTreg ha confirmado que éstas células muestran tendencia a reconocer autoantígenos presentes en el timo. La afinidad de su TCR por los autopéptidos parece estar entre la necesaria para permitir la selección positiva en los linfocitos T convencionales y la que ocasiona su delección. Aunque el repertorio de TCR presente en los linfocitos T convencionales difiere del de las células nTreg, hay una zona amplia de solapamiento (32).

Además de las señales proporcionadas a través del TCR, la estimulación a través de CD28 parece imprescindible en el desarrollo tímico de las células nTreg (33), ya que los ratones deficientes en CD28 y CD80/86 tienen reducido el número de células nTreg (34). La señalización a través de CD28 es necesaria para inducir p56lck, proteína que ayuda a estabilizar los transcritos de FOXP3 y, por tanto, a mantener su

expresión (35). La IL-2 proporciona otra señal esencial para el desarrollo y mantenimiento de las células, amplificando la expresión de CD25 y FOXP3. La importancia de la IL-2 en el mantenimiento de la tolerancia viene ilustrada por el hecho de que los ratones *Il-2* $-/-$ o *Il-2R* $-/-$ (tanto de las cadenas α como β).desarrollan autoinmunidad severa que se relaciona con una disminución notable del número de células T reguladoras (36). En los últimos años se ha propuesto un modelo de desarrollo de células Treg en el timo en dos pasos: inicialmente la señalización a través del TCR ocasionaría el aumento en la expresión de CD25, lo que genera células más receptivas a la IL-2, encargada de mantener la expresión de FOXP3 y CD25 (37).

1.3.1.1 Fenotipo de las células nTreg

Las células nTreg se caracterizan por expresar, de forma constitutiva, la cadena α del receptor de la IL-2, también denominado CD25 (4, 38). También son positivas para los marcadores CTLA-4 y GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*). Sin embargo, hasta la fecha, el marcador más característico de las células nTreg es el factor de transcripción FOXP3. Otras características fenotípicas de las células nTreg incluyen la baja expresión del marcador de activación temprana CD69 y de la cadena α del receptor de la IL-7 (CD127). Algunos autores han encontrado, además, una menor expresión de CD4 en las células reguladoras naturales en comparación con los linfocitos T CD4⁺ efectores (39).

A pesar de la existencia de todos estos marcadores celulares, la identificación y cuantificación en humanos mediante citometría de flujo de las células nTreg ha resultado complicada, ya que ninguno de estos marcadores es exclusivo de esta población celular. La expresión de CD25 aumenta transitoriamente con la activación, de tal forma que la distinción entre linfocitos activados y reguladores resulta a menudo complicada. Recientemente se ha propuesto a CD127 (junto con CD25) como un marcador para esta población celular (40, 41). De hecho,

dentro total de células CD25⁺, existe una correlación negativa entre FOXP3 y CD127, de tal forma que los linfocitos CD25^{high}CD127⁻ muestran un porcentaje de FOXP3 mayor del 90 % (40, 41). CD127 forma parte de un receptor de membrana, lo que sin duda resulta ventajoso respecto a FOXP3 como marcador de estas células, ya que facilita su cuantificación sin tener que recurrir a tinción intracelular y permite su aislamiento.

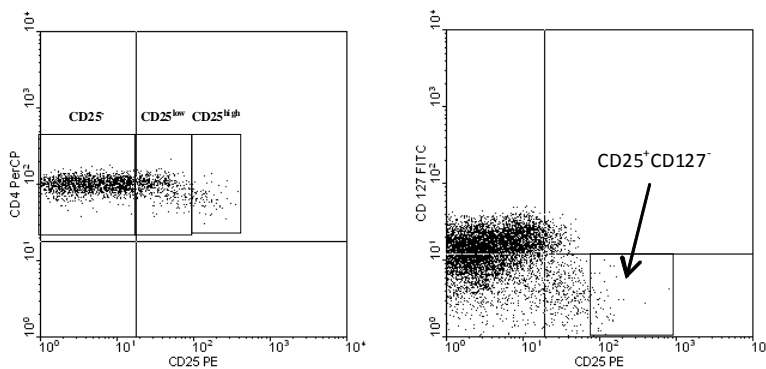


Figura 1.3 Caracterización de las células reguladoras naturales mediante citometría de flujo, según la expresión de CD25 y CD127.

1.3.1.2 Mecanismos funcionales de las células nTreg.

Las células reguladoras naturales se caracterizan por su capacidad para suprimir la proliferación y la producción de determinadas citocinas de linfocitos T efectores –aunque también controlan la proliferación de células NK, la maduración de células dendríticas y la producción de anticuerpos por parte de las células B (42)–. El mecanismo exacto a través del cual las células nTreg ejercen su función es aún desconocido, aunque se sabe que necesitan ser activadas a través del TCR (43). Sin embargo, aun cuando su activación sea antígeno-específica, ejercen su función de forma antígeno-no específica (44). Mediante experimentos *trans-well* se ha determinado que estas células necesitan contacto celular para suprimir la proliferación (38).

Se han propuesto una gran variedad de mecanismos diferentes para tratar de explicar la función de las células nTreg (42) y algunos se han

podido demostrar, al menos bajo determinadas circunstancias. Dada la elevada expresión de CTLA-4 en las células nTreg, esta molécula fue postulada como un importante mediador del mecanismo supresor de estas células, bien mediante su unión a CD80 en la células presentadora de antígeno (impidiendo así la unión de CD28 y por tanto el envío de la segunda señal al linfocito efector) o bien uniéndose directamente a CD80/86 y enviando una señal negativa (45). Sin embargo, la implicación de CTLA-4 en la función reguladora encontrada en humanos no ha sido corroborada en determinados modelos murinos (46). En ratones, Nakamura et al. (47) mostraron que el mecanismo de inmunosupresión de las células reguladoras naturales estaba mediado por TGF β unido a la membrana de las mismas, aunque sus resultados no fueron corroborados por otros autores (48). En humanos se ha demostrado otro mecanismo de supresión, en el que las células reguladoras naturales son capaces de lisar las células diana mediante la producción de granzima A y perforina (49), aunque este mecanismo no explica muchos de los efectos reguladores observados *in vitro*. Más recientemente Borsellino et al. (50) mostraron que las células reguladoras naturales murinas expresan en membrana, de forma constitutiva, la ectonucleotidasa CD39, capaz de degradar el ATP extracelular. La presencia de ATP en el medio extracelular es detectado como una “señal de peligro” que ocasiona la activación del sistema inmune y el desarrollo de una respuesta de tipo inflamatorio. Así pues, según este mecanismo, las células nTreg serían capaces de degradar el ATP extracelular atenuando la respuesta inmune. Este mecanismo, sin embargo, no explica la necesidad de contacto celular en los experimentos realizados *in vitro*, y parece ser sólo una forma más mediante la cual las células reguladoras naturales realizan su función. De hecho, ninguno de los mecanismos anteriormente citados ha sido capaz de explicar totalmente la función reguladora de estas células y parece claro que más de uno de ellos debe estar implicado.

1.3.2 Células reguladoras inducidas (iTreg)

Las células iTreg, al contrario que las naturales, se originan en periferia, bien en el contexto de una respuesta inmune normal, o tras en encuentro con una APC tolerogénica y constituyen un mecanismo muy importante en el control y mantenimiento de la tolerancia. Estas células reguladoras se generan a partir de precursores vírgenes y permiten la generación de tolerancia frente a antígenos que no están presentes en el timo, como los antígenos derivados de los alimentos, la flora bacteriana o determinados autoantígenos.

Se han descrito diferentes tipos de células T reguladoras inducidas, entre las que destacan las células Tr1, las Th3 y una población de células T CD4⁺ que suprimen la proliferación mediante contacto celular y que se caracterizan por expresar FOXP3. Así pues, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes pueden diferenciarse en periferia hacia al menos 3 poblaciones de células efectoras distintas (Th1, Th2 y Th17) y otras tantas de células reguladoras inducidas (Fig. 1.4).

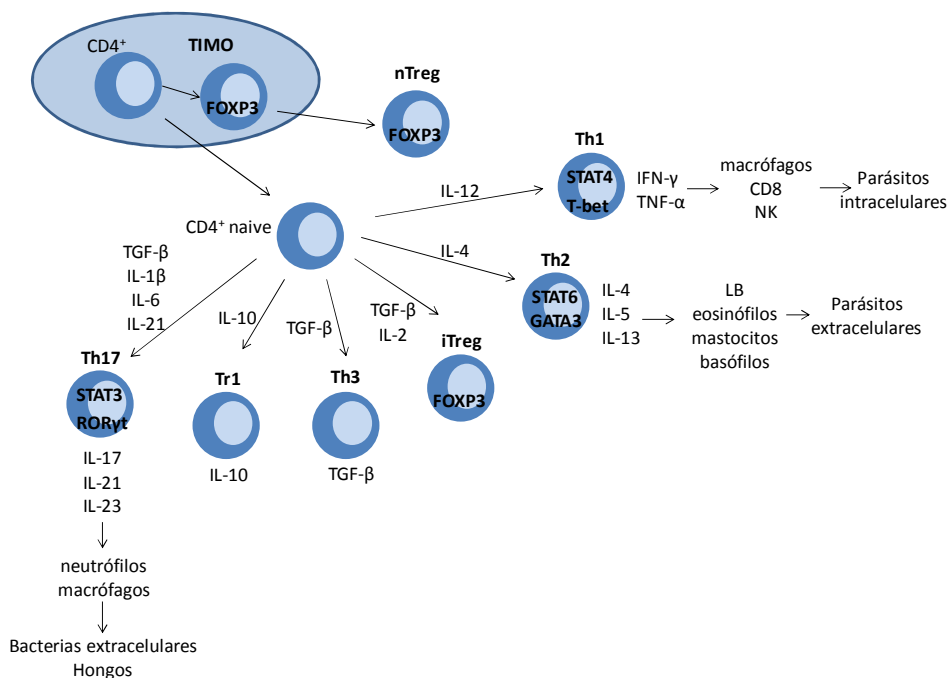


Figura 1.4 Principales poblaciones de células T CD4⁺ efectoras y reguladoras.

Tr1. Las células reguladoras inducidas secretoras de IL-10, denominadas Tr1, se generan tras estimulación repetida del TCR en presencia de IL-10 y se caracterizan por producir grandes cantidades de esta citocina inmunosupresora (además de pequeñas cantidades de TGF β), (51). Estas células han demostrado ser capaces de regular la respuesta inmune *in vitro*, ocasionando la inhibición de la proliferación de células T CD4⁺ y manteniendo las células dendríticas en estado inmaduro. Las células Tr1 también son capaces de suprimir la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B (52). Todas estas acciones están mediadas por la producción de IL-10 y TGF β , como queda demostrado por el hecho de que la neutralización de estas dos citocinas suprime totalmente su función (53). Las células Tr1 también se han identificado *in vivo*, especialmente en individuos transplantados, en los cuales se ha podido encontrar una correlación entre la presencia de esta subpoblación y la supervivencia del injerto (54, 55).

Th3. La administración oral de un antígeno ocasiona el desarrollo de tolerancia frente al mismo. La tolerancia oral es un proceso activo que se establece en el tejido linfoide asociado al sistema gastrointestinal y que incluye deleción, anergia y generación de células reguladoras denominadas Th3 (56). Estas células se caracterizan por producir TGF β y pequeñas cantidades de IL-10, mediante las cuales ejercen sus funciones tanto *in vivo* como *in vitro* (57).

Funcionalmente, las células reguladoras Tr1 y Th3 se diferencian de las naturales por su mecanismo de acción. Mientras que las nTreg ejercen su función mediante contacto celular, las Tr1 y Th3 inhiben la proliferación mediante la producción de mediadores solubles (IL-10 y TGF β).

Células iTreg FOXP3⁺. La generación en periferia de células Treg inducidas con características fenotípicas y funcionales similares a las nTreg ha sido descrita tanto en ratones como en humanos. La existencia

de estas células –y la demostración de que no se originan en el timo– provienen de estudios realizados en ratones en los que se identificaron células Treg en periferia con características de células nTreg en condiciones en las que su generación en el timo no era posible (58). La administración oral, subcutánea o intravenosa de un antígeno, o la exposición repetida a un superantígeno en ratones ha demostrado ser capaz de inducir células CD4⁺CD25⁺ Treg en periferia (59, 60). En humanos, el hallazgo de que una gran proporción de células reguladoras CD4⁺CD25⁺ pertenece a la subpoblación de memoria y tienen telómeros cortos parece indicar que estas células tienen un fenotipo propio de células CD4⁺ diferenciadas que han experimentado varios episodios de estimulación *in vivo*. Esto sugiere que, efectivamente, estas células pueden ser generadas en periferia como consecuencia de encuentros repetidos con el antígeno (61).

La generación *in vitro* de células Treg a partir de células T CD4⁺CD25⁻ también ha sido demostrada por numerosos grupos de investigación. En todos los casos es necesaria la activación de los linfocitos no reguladores, bien con el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (62-64), el uso de células dendríticas maduras (65) o antígenos específicos (66, 67). Aunque las células generadas de esta forma en humanos poseen características fenotípicas similares a las de las células nTreg, concretamente la expresión de FOXP3, existen discrepancias acerca de su funcionalidad, ya que no siempre se ha encontrado una correlación entre la expresión de este factor de transcripción y la actividad reguladora.

Menos controversias existen, en cambio, con las células reguladoras generadas *in vitro* con TGFβ. El TGFβ es una citocina supresora involucrada en la inducción de tolerancia y en la regulación del sistema inmune, aunque los mecanismos a través de los cuales realiza estas funciones no son del todo conocidos. Diversos trabajos han demostrado la capacidad del TGFβ (en conjunción con estimulación a través del

TCR) para inducir la expresión de FOXP3 y la adquisición de capacidad reguladora en linfocitos CD4⁺ no reguladores, tanto en ratones (68-71), como en humanos (71, 72). El TGF- β induce la generación de células Th17 en presencia de IL-6 (73), pero promueve la diferenciación hacia células Treg en presencia de IL-2 y ausencia de IL-6 (69).

En humanos, la simple activación a través del TCR parece ser suficiente para inducir la expresión de FOXP3, un hecho consistente con la capacidad de NFAT y AP-1 para unirse al promotor de FOXP3 (74). La activación mediante el TCR en presencia de TGF- β e IL-2 ocasiona la fosforilación de STAT5 y la inducción del factor de transcripción FOXP3, dando lugar a la generación de células iTreg (75). El STAT5 fosforilado se une al promotor de FOXP3 y a una región no codificante que se encuentra en el extremo 3' del segundo intrón, siendo su activación crítica para la generación de células iTreg en periferia.

Por otro lado, la expresión de FOXP3 en células generadas en periferia o *in vitro*, al contrario de lo que ocurre en las células nTreg parece ser transitoria (76). Lo mismo ocurre con su capacidad de supresión de la proliferación (77). Recientes trabajos han demostrado la importancia del control epigenético sobre la estabilidad en la expresión de FOXP3 (78, 79). De hecho, las células nTreg poseen en el locus de FOXP3 una región conservada con motivos CpG completamente desmetilados (*Treg specific demethylation region*, TSDR) que, sin embargo está metilada en las células CD4⁺CD25⁻. Curiosamente, el tratamiento de linfocitos CD4⁺CD25⁻ con TGF β ocasiona sólo la desmetilación parcial de esta región, lo que parece ser la causante de la expresión transitoria de FOXP3 y su actividad reguladora (78).

1.4 FOXP3 (forkhead box protein 3)

A principios del año 1949, en el Oak Ridge National Laboratory (USA), una generación consanguínea de ratones desarrolló, de forma espontánea, la mutación *scurfy*. Estos ratones presentaban, entre otros

síntomas, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, infiltrados linfocitarios en gran variedad de órganos, diarrea crónica y dermatitis. Los ratones morían a las tres-cuatro semanas del nacimiento. Estudios posteriores encontraron que el gen responsable de la mutación *scurfy* estaba ligado al cromosoma X, pero no fue hasta el año 2001 cuando *Foxp3* fue identificado como el gen mutado en estos ratones (80). La mutación generaba una proteína truncada no funcional y la ausencia total de células reguladoras naturales en estos ratones, que podían ser rescatados de la enfermedad mediante la infusión de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺.

FOXP3 es un miembro de la familia de factores de transcripción forkhead/winged-helix caracterizada por poseer un dominio forkhead (FKH) de unión a DNA. FOXP3 contiene, además, otros dominios estructurales: cremallera de leucinas (el cual parece ser necesario para la formación de homo y heterodímeros) y dominio de dedos de zinc. El extremo amino terminal, aunque no está del todo bien caracterizado, es necesario para la actividad represora de FOXP3 y contiene un gran número de residuos de prolina (81). FOXP3 puede reprimir la expresión de multitud de genes, especialmente los genes que codifican para citocinas, como la IL-2 y el IFN γ . También puede actuar como activador de la transcripción de otros muchos genes, entre los que se encuentran aquellos que se expresan en las células reguladoras naturales: GITR, CTLA-4 y CD25, mientras que la expresión de CD127 es reprimida por FOXP3. De hecho, en células nTreg de ratones se ha demostrado que FOXP3 se encuentra activando o reprimiendo la transcripción de unos 700 genes, si bien no actúa directamente sobre todos ellos (82). Diversos estudios han mostrado que FOXP3 realiza sus funciones mediante la asociación con miembros de la familia de NFAT y NF- κ B con los que interactúa a través de su dominio FKH (83, 84). De hecho, para ejercer sus funciones, FOXP3 recluta una gran cantidad de proteínas (entre las que se encuentran una gran variedad de factores

remodeladores de la cromatina) y forma un enorme complejo proteico capaz de unirse a la cromatina y regular la transcripción génica (85). Más recientemente se ha demostrado que FOXP3 interactúa físicamente con ROR γ t y de esta forma es capaz de inhibir su actividad transcripcional (86). Sin embargo, a pesar de los progresos realizados en el entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en las funciones de FOXP3, existen aún muchas cuestiones sin resolver a este respecto.

Dado el papel que FOXP3 juega en el desarrollo y la funcionalidad de las células Treg, ha sido considerado el factor de transcripción maestro de esta población. Sin embargo, la expresión de FOXP3 no siempre se ha relacionado con adquisición de capacidad reguladora en humanos. De hecho, en varios estudios se han generado células FOXP3 positivas sin capacidad reguladora (75, 76, 87, 88), incluyendo células FOXP3 positivas generadas mediante transfección con vectores que codifican para FOXP3 (89). Otros autores, en cambio, han observado en humanos una fuerte relación entre la expresión de FOXP3 y la anergia en células T activadas (90).

En humanos existe un síndrome con características similares a las de los ratones *scurfy*. Este síndrome se conoce con el nombre de IPEX (*immune dysfunction polyendocrinopathy enteropathy X-linked*) y se caracteriza, principalmente, por diarreas, dermatitis y desarrollo de endocrinopatías autoinmunes (generalmente diabetes tipo 1 y tiroiditis). Los síntomas aparecen en los primeros días de vida y generalmente los individuos fallecen antes de los dos años (91). Dada la similitud existente entre los síntomas de los ratones *scurfy* y los individuos con síndrome IPEX, se comenzó a estudiar la posible existencia de mutaciones en *FOXP3* en humanos. Desde entonces se han descubierto una gran variedad de mutaciones en *FOXP3* en personas afectadas de IPEX, la mayor parte de las cuales son mutaciones sin sentido en el dominio FKH, que afectan a la habilidad de FOXP3 para

unirse al DNA. También se han encontrado mutaciones en el dominio de cremallera de leucinas, que afectan a la capacidad de formar homo y heterodímeros, y en el dominio represor. Curiosamente, no todos los pacientes que padecen síndrome IPEX tienen mutaciones en *FOXP3*. Muy probablemente estos pacientes presenten mutaciones en otros genes, cuyos productos interactúan, física o funcionalmente, con FOXP3(81).

1.5 PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS

Durante la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ éstos adquieren las características propias de cada uno de los linajes helper, con un fenotipo y funciones típicas. Inicialmente se suponía que una vez que se comprometían en un sentido determinado no podían ser alterados, incluso si se transferían a un ambiente de citocinas que pudiera favorecer otro linaje distinto. Sin embargo, las células Th son más heterogéneas y plásticas de lo que inicialmente se había pensado. Ha habido hallazgos recientes que indican que las células diferenciadas pueden re-programarse y *convertirse* en otros tipos de células efectoras, en un proceso que algunos autores denominan trans-diferenciación. Efectivamente, las células Th pueden ser reprogramadas para expresar factores de transcripción propios de otras subpoblaciones helper. De hecho, los diferentes factores de transcripción maestros pueden ser co-expresados en la misma célula, aunque a diferentes niveles, lo cual podría constituir una explicación inicial para los fenómenos de plasticidad observados.

La mayor parte de las evidencias que apoyan el fenómeno de trans-diferenciación provienen del análisis de las células Treg y Th17. Las células Th1 y Th2 parecen tener un fenotipo más estable, probablemente debido a la regulación mutua que ejercen no sólo las citocinas que producen sino también los factores de transcripción típicos de cada linaje. Así, GATA3 disminuye la expresión de STAT4

(92), mientras que T-bet ha demostrado ser capaz de inhibir la expresión de GATA3 (93). Sin embargo, se han descrito ciertos fenómenos de plasticidad dentro de las subpoblaciones Th1 y Th2. Por ejemplo, las células Th2 pueden ser inducidas a secretar IFN γ , sin perder su capacidad para producir IL-4. Estas células co-expresan T-bet y GATA3, si bien la expresión de GATA3 es menor que en las células Th2 clásicas (94).

Por el contrario, las células Treg muestra una plasticidad mucho mayor; de hecho, no todas las células FOXP3⁺ parecen estar completamente comprometidas con el linaje Treg o diferenciadas de forma terminal (95), sino que muestran una propensión natural a expresar citocinas y factores de transcripción propios de otros linajes –e incluso diferenciarse en células efectoras–. Recientemente varios grupos de investigación han demostrado que las células Treg usan los factores de transcripción asociados a las células Th para mantener o restaurar la homeostasis inmune. Un estudio reciente ha demostrado que T-bet se expresa en una subpoblación de células Treg necesarias para el control de la respuesta inflamatoria de tipo Th1 (96). Estas células se generan en presencia de IL-12, la cual transforma las células Treg en células FOXP3⁺ que expresan IFN γ . Estas células FOXP3⁺IFN γ ⁺ retienen su actividad reguladora y parecen ser necesarias para suprimir la respuesta de tipo Th1 (97). De igual forma, la co-expresión de IRF4 –el factor de transcripción responsable de la expresión de IL-4 en los linfocitos Th2– en las células Treg es necesaria para inhibir la respuesta Th2. Los ratones en los que se elimina específicamente *Irf4* en las células FOXP3⁺ desarrollan una enfermedad linfoproliferativa caracterizada por un aumento en el número de células productoras de IL-4 e IL-5 (98). Asimismo, la delección de STAT3 en las células Treg resulta en el desarrollo de inflamación intestinal caracterizada por sobreproducción de IL-17, indicando que la ausencia de STAT3 en las células Treg las inhabilita para suprimir la respuesta Th17 e inhibir la

inflamación mediada por estas células (99). Con estos resultados se ha planteado un modelo según el cual las células Treg necesitan “adoptar” determinadas características de las células efectoras que tienen que inhibir para ser capaces de controlar respuestas inmunes específicas determinadas.

La mayor parte de los trabajos que han abordado el estudio de la plasticidad de las células Treg se han centrado en su propensión a diferenciarse en células Th17. Este fenómeno resultó sorprendente en un principio debido al antagonismo existente entre FOXP3 y ROR γ t. De hecho, la expresión de FOXP3 inducida por TGF β es capaz de inhibir la función de ROR γ t mediante un mecanismo que implica la interacción física entre los dos factores de transcripción (86). Sin embargo, se ha encontrado expresión simultánea de FOXP3 y ROR γ t en células con capacidad para producir IL-17 (100, 101) y parece claro que esta población es un estado intermedio con potencial para diferenciarse en células Treg o células Th17 dependiendo del medio de citocinas. Algunos autores han sugerido incluso que la fuente principal de células Th17 son las propias células Treg (102).

La presencia de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β e IL-6 parece ser la señal necesaria para la conversión de las células Treg en células efectoras. El efecto de la IL-6 ha sido muy estudiado, mostrándose que el tratamiento de las células Treg con IL-6 las convierte en células productoras de IL-17. La diferenciación hacia ambos tipos celulares requiere TGF β , pero la presencia de IL-6 parece ser el factor decisivo que ocasionará finalmente un tipo u otro de respuesta.

1.6 TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

Así como el sistema inmune debe ser efectivo en su respuesta ante agentes extraños, no menos importante es su capacidad para discriminar entre éstos y los componentes de *lo propio* (autoantígenos).

El *Modelo de lo Propio y lo No Propio (Self-Nonself Model)* (103) presupone que el sistema inmune reconoce y tolera lo propio y ataca lo extraño. No obstante, esta teoría no ha sido capaz de explicar muchas de las observaciones empíricas realizadas por los inmunólogos a lo largo de los años. De hecho, el sistema inmune es capaz de tolerar determinados agentes extraños siempre y cuando estos no dañen al huésped. Para resolver algunas de las cuestiones sin respuesta surgió el *Modelo del Peligro (Danger Model)* (104), según el cual el sistema inmune parece centrarse principalmente en reconocer el peligro, entrando en acción al detectar señales procedentes de tejidos dañados. Aunque puramente teórico al principio, numerosos datos empíricos han apoyado la validez de este modelo en los últimos años.

El término *tolerancia inmunológica* fue usado por primera vez en los años 50 del pasado siglo por Sir Peter Brian Medawar (1915-1987), en sus estudios de transplante con ratones (105). A pesar del tiempo transcurrido desde entonces, todavía resulta difícil dar una definición precisa para este término. Habitualmente se define como la ausencia controlada de respuesta frente a un antígeno, ya sea propio o extraño. Sin embargo, es difícil concebir la respuesta inmune como un fenómeno de todo o nada. La tolerancia inmunológica no parece ser, por tanto, ausencia de respuesta sino una *modalidad de respuesta diferente* que denominamos *tolerante*.

1.6.1 Tolerancia central

La tolerancia central se establece en los órganos centrales de sistema inmune, durante la formación de las células T y B. Los timocitos generan su receptor mediante recombinación somática de los segmentos V, D, J, dando lugar a la formación de un amplio repertorio de especificidades de TCR. Durante el estadio doble positivo, células epiteliales tímicas especializadas envían señales de supervivencia a los linfocitos CD4⁺CD8⁺ que expresan un TCR que se une con baja afinidad a los complejos MHC-autopéptido, en un fenómeno que se conoce como

selección positiva. En un segundo paso las células T que reaccionan con alta afinidad a complejos MHC-autopéptido son inducidas a entrar en apoptosis y se eliminan (selección negativa). De hecho, un elevadísimo porcentaje de timocitos mueren en el timo y nunca llegan a salir a periferia.

1.6.2 Tolerancia periférica

A pesar de la eficacia del proceso de eliminación de clones autorreactivos que tiene lugar en el timo y la médula ósea, no todos son eliminados. De ocurrir esto, muy probablemente el sistema inmune quedaría incapacitado para reaccionar frente a agentes patógenos. Por tanto, la presencia de clones autorreactivos en periferia no refleja un fallo en el mecanismo de selección clonal. De hecho, estas células autorreactivas están presentes en todos los individuos, aunque generalmente no causan autoinmunidad debido a que sólo son activadas bajo circunstancias especiales. Por otro lado, la eliminación de clones autorreactivos mediante selección negativa sólo genera tolerancia frente a antígenos propios presentes en los órganos linfoides primarios (autotolerancia), pero el sistema inmune necesita, además, generar tolerancia frente a antígenos extraños, así como controlar las respuestas inmunes normales; por estas razones es necesario la existencia de mecanismos de tolerancia en periferia.

Ignorancia inmunológica. Muy pocas moléculas propias pueden actuar como autoantígenos, ya que se expresan a niveles muy bajos o son inaccesibles para el sistema inmune (sitios inmunoprivilegiados). También existen antígenos que, aunque están presentes en cantidades elevadas, se unen a las células autorreactivas que los reconocen con una afinidad baja, lo que impide el desencadenamiento de la respuesta inmune. Este estado se conoce como ignorancia inmunológica.

Anergia. La anergia ocurre cuando las células T interactúan con células presentadoras de antígeno que les proporcionan la primera señal

(péptido/MHC-TCR) pero no la co-estimulación (B7-CD28). Habitualmente la célula presentadora de antígeno produce la señal co-estimuladora sólo cuando existe inflamación o daño tisular. En caso contrario se considera que la APC (típicamente una célula dendrítica) es tolerogénica. Sin embargo, las células anérgicas pueden aparecer en otras situaciones, por ejemplo si la activación se produce en presencia de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10.

Delección. Además de en los órganos linfoides primarios, la delección puede ocurrir en periferia. Los linfocitos T sometidos a una primera señal muy intensa son inducidos a entrar en apoptosis, evitándose la generación de respuestas inmunes excesivamente agresivas.

Un nivel adicional de regulación en periferia lo proporcionan las **células T reguladoras**. A diferencia de los mecanismos anteriormente citados, las células reguladoras ejercen una tolerancia activa o dominante, que no se basa únicamente en ausencia de respuesta, sino en el desarrollo de una serie de acciones que se efectúan sobre otras células del sistema inmune. Las células reguladoras juegan, además, un papel principal en la homeostasis inmunológica. La regulación de la respuesta inmune por las células reguladoras es muy importante en la resolución de la inflamación, el control de los mecanismos efectores y la minimización del daño a los tejidos y órganos del huésped.

1.7 EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

1.7.1 Etiología

La etiología del Lupus Eritematoso Sistémico (LES) sigue siendo tan enigmática como lo era hace 50 años, muy probablemente debido a que no existe un único factor involucrado en su aparición y desarrollo. Aunque se sabe que existe cierta predisposición genética a padecer la enfermedad –los familiares directos de un paciente de LES tienen una mayor probabilidad de sufrir la enfermedad– no menos importantes

son los factores ambientales. Entre los factores ambientales se han descrito la presencia de agentes infecciosos (virus de Epstein-Barr), la radiación UV y el uso de determinados fármacos.

Los primeros indicios que sugirieron la existencia de una predisposición genética a padecer lupus provinieron de estudios realizados con gemelos idénticos, en los que se observó una alta concordancia del LES. Se han descrito más de 100 genes que parecen estar involucrados con la susceptibilidad a padecer LES, entre ellos genes del complejo principal de histocompatibilidad (asociación con HLA-DR2 y DR3) (106, 107), genes codificadores de factores de complemento (108), genes relacionados con la activación de linfocitos B (*BANK1*) (109, 110) y muchos genes de citocinas o relacionados con ellas: *IL-21* (111), *TNFA*, *IL-10* (112) e *IRF5*(113), entre otros.

1.7.2 Epidemiología

La prevalencia del LES varía según el área geográfica entre 4 y 250 casos por cada 100000 habitantes. En la población caucasoide la prevalencia es más baja –entre 10 y 50 casos por cada 100000 habitantes, según los estudios– que en las poblaciones de raza negra, hispanos e indígenas americanos. La prevalencia también depende de la edad y del sexo. El LES, al igual que ocurre con otras enfermedades autoinmunes, se manifiesta mayoritariamente en mujeres en edad fértil. El último estudio realizado en la población asturiana con LES (114) la prevalencia fue de casi 43 casos por cada 100000 habitantes, siendo el ratio mujer/hombre de 7/1. La mayor parte de los pacientes se diagnosticaron entre los 15 y 49 años.

La incidencia de LES también varía según el área geográfica. Se han descrito tasas de incidencia anual de entre 1 y 10 casos por cada 100000 habitantes. La tasa de incidencia media anual entre los años 2003 a 2008 en Asturias fue de 1.5 casos/100000 habitantes.

1.7.3 Clínica y diagnóstico

El LES es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por una amplia diversidad de manifestaciones clínicas, así como por la presencia de una gran variedad de autoanticuerpos. Los pacientes de LES pueden tener afectado prácticamente cualquier órgano o tejido (115). La variabilidad en la sintomatología del LES dificulta mucho su diagnóstico, por lo que se realiza en base a un conjunto de datos clínicos y de laboratorio internacionalmente reconocidos propuestos por la *American College of Rheumatology* (ACR) (116, 117). Un paciente es diagnosticado de LES cuando reúne, al menos, 4 de los 11 criterios (Tabla 1.1). Además de la clínica descrita en los criterios del ACR los pacientes de LES pueden presentar otros síntomas que, a pesar de no ser suficientemente sensibles o específicos, son muy frecuentes en esta enfermedad autoinmune y aumentan la sospecha del diagnóstico (astenia, fiebre, altralgias y mialgias entre otros).

El LES suele cursar con recidivas y remisiones aunque, al igual que su sintomatología, la evolución es variable. Algunos pacientes permanecen en remisión por largos periodos de tiempo, otros presentan brotes puntuales y un tercer grupo exhibe enfermedad activa mantenida. Dada la cronicidad de la enfermedad los pacientes de LES deben someterse a controles periódicos, cuya frecuencia depende de la gravedad y del tratamiento. En estos controles es aconsejable evaluar la actividad y el daño orgánico del paciente, al ser posible, de forma cuantitativa. Para ello se han desarrollado en los últimos años diversos índices que permiten estimar el estado de actividad de la enfermedad. Uno de los más utilizados en la actualidad, por su sencillez y exactitud, es el SLEDAI.

Tabla 1. 1 Criterios de la ACR para el diagnóstico del LES.

Criterio	Definición
1.- Eritema malar	Eritema fijo, plano o elevado, sobre los pómulos, que respeta los surcos nasolabiales.
2.- Lesión discoide	Placas eritematosas elevadas, con queratosis periférica y taponamiento folicular, que dejan cicatrices atróficas.
3.- Fotosensibilidad	Exantema cutáneo resultante de una reacción anormal a la luz solar.
4.- Úlceras orales	Úlceras orales o nasofaríngeas, generalmente indoloras.
5.- Artritis	Artritis no erosiva que afecta a dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor, tumefacción o derrame.
6.- Serositis	Pleuritis: dolor pleurítico, roce o evidencia de derrame pleural o Pericarditis: confirmada por ECG, roce o evidencia de derrame pericárdico.
7. Enfermedad renal	Proteinuria persistente mayor de 0,5g/24h o de 3+ si no se cuantifica, o Cilindros celulares, integrados por hematíes o hemoglobina, de tipo granular, tubular o mixto.
8.- Enfermedad neurológica	Convulsiones o psicosis en ausencia de otras causas (fármacos o alteraciones metabólicas).
9.- Enfermedad hematológica	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anemia hemolítica con reticulocitosis o ○ Leucopenia: <4000/μl en dos o más determinaciones o ○ Linfopenia: <1500/μl en dos o más determinaciones o ○ Trombocitopenia: <100000/μl en ausencia de fármacos inductores.
10.- Alteraciones inmunológicas	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anticuerpos anti-ADN nativos, o ○ Anticuerpos anti-Sm, o ○ Anticuerpos antifosfolípidicos, basados en: niveles séricos elevados de anticardiolipina IgG o IgM o test positivo para anticoagulante lúpico Serología luética falsa positiva.
11.- Anticuerpos antinucleares	Título positivo por inmunofluorescencia, o prueba equivalente, en cualquier momento y en ausencia de fármacos que induzcan lupus.

1.7.4 Tratamiento

Aunque en los últimos años se han comenzado a utilizar nuevos medicamentos para el tratamiento del LES, aún no existe un tratamiento curativo para la enfermedad. Los avances en el manejo de la enfermedad provienen fundamentalmente de la mejora en el diagnóstico precoz y de un mejor uso de los tratamientos clásicos. De esta forma se ha conseguido disminuir la mortalidad del LES considerablemente. Los tratamientos farmacológicos más utilizados en el LES son los antipalúdicos, corticoides e inmunosupresores. Los antipalúdicos se utilizan desde hace décadas para el tratamiento de las enfermedades reumáticas. Se recomienda su uso en todos los pacientes de LES, ya que previenen la aparición de brotes y han demostrado tener efectos antilipemiantes y antitrombóticos. No se conoce con exactitud su mecanismo de acción, aunque parece claro que actúan a varios niveles. Los corticoides se utilizan para el control de LES moderado-grave, aunque las dosis utilizadas pueden variar mucho de unos pacientes a otros. Los inmunosupresores suelen utilizarse para reducir la actividad de la enfermedad en casos graves o para disminuir la dosis de corticoides.

1.7.5 Corticoides

Las hormonas esteroideas son producidas de forma natural en las glándulas suprarrenales y otros órganos endocrinos a partir del colesterol. Los esteroides incluyen las hormonas sexuales, producidas principalmente en las gónadas (andrógenos, estrógenos y progestágenos) y los corticoides (o corticoesteroides), producidos en las glándulas suprarrenales. En la zona glomerulosa de corteza adrenal se produce aldosterona, uno de los mineralocorticoides más importantes, encargada del control de la concentración de electrolitos en sangre y de la volemia. La zona fasciculada reticular secreta fundamentalmente cortisol y dehidroepiandrosterona. El cortisol (o hidrocortisona) es el glucocorticoide más abundante en suero humano.

La clasificación de los corticoides en gluco- o mineralocorticoides depende fundamentalmente de sus efectos sobre el metabolismo de glúcidos (glucocorticoides) y el balance hidrosalino (mineralocorticoides). Aunque la capacidad de retener sodio de los glucocorticoides es menor que la de los mineralocorticoides, todos los glucocorticoides pueden tener cierta acción mineralocorticoidea. Por ejemplo, el tratamiento con hidrocortisona causa aumento de la retención de sodio, incremento de la volemia y el consecuente desarrollo de hipertensión (118). Los glucocorticoides pueden actuar como mineralocorticoides debido a que tienen cierta capacidad para unirse al receptor de mineralocorticoides y funcionar como agonistas (119).

Además de sus acciones sobre el metabolismo de proteínas, glúcidos y lípidos y sus efectos sobre el balance hídrico, los corticoides se encargan del control del estrés orgánico y ejercen muchos efectos sobre el sistema inmune (120, 121) aunque los glucocorticoides y mineralocorticoides parecen tener efectos opuestos sobre él. Mientras que los glucocorticoides son conocidos por sus acciones antiinflamatorias –son capaces de controlar muchas de las reacciones mediadas por células T e inhibir la síntesis de numerosas citocinas pro-inflamatorias–, los mineralocorticoides promueven la inflamación vascular e incrementan la expresión de algunos biomarcadores de la inflamación (122).

Los glucocorticoides (GC) pueden ejercer su acción mediante dos vías distintas:

- Mecanismos no genómicos: se producen a altas dosis y de manera muy rápida, cuando todavía no ha dado tiempo a que se produzca la transcripción y traducción. A dosis altas, los glucocorticoides, debido a sus características lipofílicas, pueden disolverse en la membrana plasmática, alterando sus

características físico-químicas y las propiedades de las proteínas asociadas a ellas

- Mecanismos genómicos: implican la unión del glucocorticoide al receptor de glucocorticoides (GC-R), que se encuentra en el citoplasma de la mayor parte de las células humanas. Los GC-R contienen 3 dominios estructurales principales: dominio de unión a glucocorticoides, dominio de unión a proteínas de choque térmico (hsp) y dominio de unión a DNA. Los glucocorticoides atraviesan la membrana de las células de forma pasiva y en el citoplasma se unen al receptor de glucocorticoides. Así, el corticoide y su receptor atraviesan la membrana nuclear y pueden regular la transcripción génica (activándola o inhibiéndola) de tres formas distintas:

(a) Unión directa a secuencias específicas del DNA, denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE, *glucocorticoids responsive elements*). Estas secuencias se encuentran en los promotores de muchos genes.

(b) Mediante otros factores de transcripción, NF- κ B, AP-1 y STATs.

(c) Alteración de la estabilidad de determinadas moléculas de RNA mensajero. Los corticoides son capaces de activar la transcripción de ribonucleasas capaces de degradar el RNA mensajero.

Mediante estos mecanismos se ha demostrado que los GC logran la reducción de la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos, enzimas proinflamatorias, producción de peróxido por los neutrófilos, y la producción de muchas citocinas y quimiocinas, receptores de membrana y moléculas de adhesión. Los GC son también capaces de incrementar la transcripción de algunas moléculas, como la IL-10 y el receptor de la IL-6 (121).

Recientes estudios realizados en ratones y humanos han puesto de manifiesto la posibilidad de que los corticoides ejerzan parte de sus acciones anti-inflamatorias mediante la generación o expansión de células Treg. En concordancia con estos resultados, recientemente se ha visto que los pacientes de lupus tratados con corticoides presentan un porcentaje de células CD4⁺CD25^{high} significativamente mayor que aquellos que no reciben este tratamiento (123). Además, estos pacientes muestran una mayor expresión de RNA de FOXP3 en células de sangre periférica (124). Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual los GC ejercen estas acciones y, de hecho, se han planteado diferentes explicaciones. Los GC podrían expandir la población de células CD25⁺FOXP3⁺ o podrían generarlas a partir de linfocitos CD25⁻FOXP3⁻. Por otro lado, los GC podrían ejercer sus acciones de forma indirecta, eliminando selectivamente las células CD25⁻FOXP3⁻ (125).

1.7.6 Patogenia

Aunque el mecanismo por el cual se rompe la tolerancia en el LES es aún desconocido, éste debe ser el evento principal que desencadena la respuesta inmune frente a los antígenos propios, que finalmente ocasionan el daño tisular. Se ha puesto un especial interés en el estudio de los autoanticuerpos como principal factor patogénico en el LES, ya que esta enfermedad se caracteriza por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra un gran número de moléculas propias del núcleo, el citoplasma y la superficie celular (tabla 1.2). La generación de los autoanticuerpos se produce por la activación inicial de linfocitos T autorreactivos, lo que ocasiona la liberación de citocinas que activan a los linfocitos B. Estas células comienzan a producir anticuerpos contra los antígenos propios que forman inmunocomplejos que se pueden depositar en los tejidos y originar la respuesta inflamatoria y, en última instancia, el daño tisular.

Sin embargo, la presencia de autoanticuerpos no es suficiente para explicar los mecanismos patogénicos de la enfermedad. De hecho, los autoanticuerpos están presentes en baja concentración en todas las personas sin llegar a causar enfermedad autoinmune. En la actualidad está cobrando un creciente interés la concepción del lupus como una enfermedad en la que existe una alteración en la apoptosis o en los mecanismos de eliminación de los cuerpos y vesículas apoptóticas. Según este modelo, las vesículas y residuos apoptóticos serían la fuente principal de autoantígenos (Fig. 1.4).

Tabla 1.2 Principales autoanticuerpos en el LES

	Antígeno	Autoanticuerpo
Anticuerpos antinucleares (ANAs)	DNA	Anti-DNA nativo (dsDNA) Anti-DNA desnaturalizado
	Antígenos nucleares extraíbles (ENAs)	Anti-Sm Anti-RNP Anti-SSA Anti SSB
	Histonas Nucleosomas Fosfoproteínas ribosomales	Anti-histonas Anti-nucleosomas Anti-P0 Anti-P1 Anti-P2
Anticuerpos antifosfolípidos	Fosfolípidos	Anticardiolipina Anticoagulante lúpico
Factor reumatoide	Fragmento Fc de IgG	Anti-IgG

1.7.7 Implicación de las células T reguladoras y efectoras en la patogenia del LES

El papel de las células T CD4⁺ en el lupus ha sido ampliamente estudiado, a pesar de lo cual aún existe controversia acerca de la contribución de las subpoblaciones T CD4⁺ en la patogénesis del LES.

Las células Th1 han sido consideradas históricamente esenciales en el desarrollo de autoinmunidad. Estas evidencias provenían de los estudios realizados en modelos murinos de enfermedades autoinmunes como la encefalitis autoinmune experimental (EAE), artritis inducida

por colágeno y enfermedad inflamatoria intestinal, en los que el desarrollo de la enfermedad podía ser detenido mediante la neutralización de la subunidad p40 de la IL-12 o tras la delección del gen *Il-12Rbeta1* (126). Sin embargo, había algunos hechos científicos que parecían rebatir esta idea –los ratones deficientes en IFN γ o en su receptor seguían siendo capaces de desarrollar enfermedad autoinmune e incluso se mostraban más susceptibles a la EAE (126, 127)–.

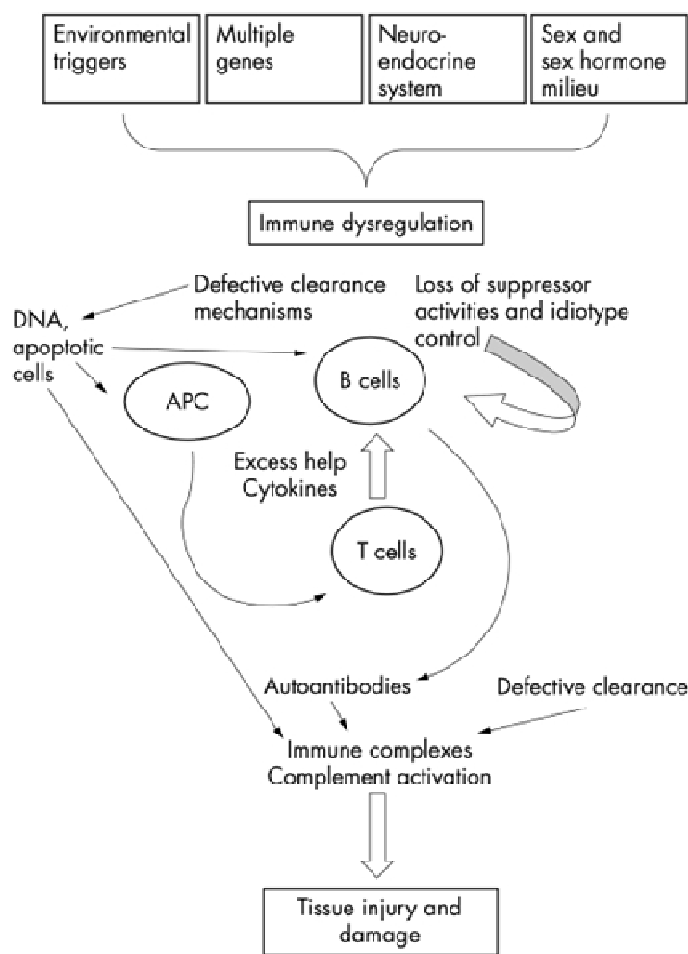


Figura 1.5 La existencia de defectos en los mecanismos de eliminación de células apoptóticas e inmunocomplejos es un importante contribuyente a la patogénesis del LES. Moc CC y Lan CS. J Clin Pathol. 2003. 56(7):481-90.

El descubrimiento de la IL-23, una citocina clave en la respuesta Th17, implicó la revisión de la relación de la IL-12 y las células Th1 con estas

enfermedades. La IL-23 está formada por dos subunidades, p19 y p40, y esta última es compartida con la IL-12. De igual forma, sus respectivos receptores comparten una de las cadenas: el receptor de la IL-12 está formado por las cadenas IL-12R β 1 e IL-12R β 2 y el receptor de la IL-23 por IL-12R β 1 e IL-23R. Tras el descubrimiento de la IL-23 se comprobó que la EAE y la artritis inducida por colágeno no se producían en ratones deficientes en la subunidad IL-23p19 o en la cadena IL-23R del receptor de la IL-23, pero sí en aquellos *Il-12p35* *-/-* o *Il-12Rbeta2* *-/-*, sugiriendo que era la IL-23, y no la IL-12, la citocina relacionada con el desarrollo de autoinmunidad (128).

A partir de ese momento se comenzaron a encontrar otras evidencias de la implicación de las células Th17 en la autoinmunidad, especialmente en la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn. Sin embargo, su papel en el lupus es menos claro. El LES es una enfermedad en la que predomina la respuesta inmune humoral, esto es, la producción de anticuerpos por parte de las células B, las cuales necesitan de la cooperación de los linfocitos Th2. Por esta razón el LES se ha considerado clásicamente una enfermedad tipo Th2 o, al menos, con una desviación hacia Th2, con el consecuente detrimento de la respuesta Th1. De hecho, varios estudios han descrito niveles bajos de IFN γ y otras citocinas Th1, acompañados de aumento en las citocinas tipo Th2 (129-131). Otros autores, por el contrario, publicaron una tendencia hacia respuesta Th1 en pacientes lúpicos (132), especialmente en aquellos con nefritis (133), mientras que algunos trabajos han demostrado elevación tanto de las citocinas Th1 como de las Th2 (134, 135). Además, el aumento de otras citocinas, como el TNF α y la IL-10, es también una característica típica del LES (124). Todos estos resultados no han logrado clarificar el escenario, pero sin duda indican que el desbalance de citocinas es una característica prominente de este desorden autoinmune.

Recientemente han aparecido evidencias claras de la implicación de la IL-17 en la patogénesis del LES, tanto en modelos murinos de la enfermedad (136, 137) como en pacientes de lupus, describiéndose niveles elevados de IL-17 –y otras citocinas relacionadas con la respuesta Th17, como la IL-6, IL-21 e IL23– en el suero en estos individuos, especialmente en aquellos con enfermedad activa (138, 139). Dos estudios reciente ha demostrado que la IL-17 podría promover la supervivencia de las células B y su diferenciación en células secretoras de anticuerpos (140, 141).

El papel de las células Treg en las enfermedades autoinmunes ha sido ampliamente estudiado, dado que la deficiencia en la función de estas células se acompaña normalmente de un aumento en la respuesta de las células T efectoras. Se ha puesto una especial atención al estudio de las células reguladoras naturales CD4⁺CD25^{high}, debido a que su ausencia o disminución es capaz de generar enfermedades autoinmunes o inflamatorias, tanto en humanos (142) como en ratones (4).

El estudio de la población de células reguladoras en LES ha resultado ser muy complejo, debido, en gran parte, a la dificultad para encontrar un marcador adecuado que permita distinguir entre células reguladoras y células activadas. Por otro lado, la mayor parte de estos estudios se han realizado en pacientes con diferentes grados de afectación y bajo tratamientos diferentes. Varios estudios han encontrado que las personas afectadas de LES tienen alterado el número o la capacidad funcional de estas células (143-146). En el ya mencionado trabajo desarrollado por Sakaguchi et al en 1995 (4) los ratones a los que se le eliminaba las células CD25^{high} desarrollaban anticuerpos anti-dsDNA, una característica típica del lupus. Algunos estudios han demostrado que los pacientes de LES tienen menos células Treg mientras que otros descubrieron que las células Treg de los pacientes de lupus activos son menos funcionales que las de individuos sin patología autoinmunes (143-146). Un trabajo desarrollado por Valencia et al. (143) demostró

que las células T reguladoras de pacientes de LES, inicialmente disfuncionales, recuperaban su actividad normal tras ser estimuladas y expandidas *in vitro*. Estos resultados parecen indicar claramente que la presencia de alteraciones en la cantidad o funcionalidad de las células T reguladoras contribuye a la patogénesis del LES.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Existen claras evidencias de la implicación de las células T CD4⁺ efectoras y reguladoras en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, por lo que no sería de extrañar que el LES presentara alteraciones importantes en estas poblaciones celulares, que podrían verse modificadas por el uso de determinados tratamientos. Por ello nos propusimos estudiar el papel de las células efectoras Th17 y Th1 y de las células FOXP3⁺ en el LES, poniendo especial atención a la posible asociación con las características de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

Por otra parte, estudios previos sugieren que los corticoides inducen el incremento de la población de células Treg y de la expresión de FOXP3, por lo que otra de las finalidades de esta tesis doctoral será determinar si estos agentes podrían ser utilizados para la generación o expansión de las células Treg *in vivo* o *in vitro* para su posterior uso terapéutico.

Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1.- Determinar el efecto de la dexametasona en la generación *in vitro* de células Treg, particularmente sobre:

- la expresión de FOXP3 y otros marcadores de células Treg
- su capacidad funcional

2.- Estudiar las poblaciones de células T CD4⁺ efectoras y reguladoras en pacientes de LES y su relación con:

- tratamientos
- características clínico-inmunológicas
- citocinas séricas y células circulantes productoras de citocinas

CAPÍTULO 2
MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 SUJETOS

Los sujetos seleccionados fueron informados sobre los estudios que se estaban realizando y el uso que se daría a las muestras sanguíneas. Todos los individuos participantes firmaron un consentimiento informado previamente a la extracción sanguínea.

2.1.1 Pacientes

Desde el año 2002 se dispone de una base de datos que contiene la práctica totalidad de los pacientes de LES de Asturias (147, 148). En esta base se registran datos demográficos y las características clínicas e inmunológicas de los pacientes de LES con residencia permanente en Asturias que cumplen los criterios diagnósticos de la ACR. Los pacientes incluidos en los estudios fueron seleccionados y citados a partir de esta base de datos o acudieron a la Consulta de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (Servicio de Medicina Interna) del Hospital Universitario Central de Asturias para la extracción sanguínea. En el momento de la toma de la muestra se determinó el índice de actividad de la enfermedad, basado en el SLEDAI, y se registró el tratamiento que el paciente había seguido durante los últimos 3 meses. Asimismo, se revisaron sus historias clínicas con el objetivo de disponer de sus características clínicas e inmunológicas actualizadas al momento de toma de la muestra.

2.1.2 Controles

Las muestras sanguíneas de controles sanos se obtuvieron de personas sanas procedentes de la misma población, seleccionadas según su edad y género.

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1 Separación de subpoblaciones celulares

2.2.1.1 Aislamiento de células mononucleares. Las células mononucleares (MNC) de donantes sanos se obtuvieron de buffy coats o de sangre periférica obtenida en tubos con

heparina-Li. Las MNC de pacientes de LES se obtuvieron de sangre periférica recogida en tubos con EDTA o heparina-Li, según el tipo de ensayo a realizar. La sangre, previamente diluida al 50 % en PBS, se centrifugó sobre Ficoll (Lymphoprep™, Noruega) (2500 rpm, 25 minutos, 21 °C). Las MNC se lavaron en PBS tres veces. Uno de los lavados se realizó a 800 rpm (12 min) para eliminar las plaquetas.

2.2.1.2 Aislamiento de linfocitos CD4⁺CD25⁻. Los linfocitos CD4⁺ fueron purificados mediante selección magnética negativa usando el *Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kit* (EasySep, StemCell Technologies Inc). La selección negativa se realiza mediante incubación de las MNC con complejos tetraméricos formados por dos anticuerpos. Uno de estos anticuerpos reconoce dextrano y el otro el antígeno expresado en las células que se desea eliminar (en este caso anticuerpos anti CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, y CD235a). Seguidamente la suspensión celular se incuba con nanopartículas magnéticas recubiertas con dextrano. Con el uso de un separador magnético (*EasySep Magnet*, Stem Cell Technologies Inc.) se eliminan las células no-CD4⁺, que quedan retenidas en el tubo. Tras el aislamiento de los linfocitos CD4⁺ se eliminaron las células CD25⁺ usando el *Human CD25⁺ Positive Selection Kit* (EasySep, StemCell Technologies Inc). Para ello los linfocitos CD4⁺ se incubaron con anticuerpos tetraméricos con especificidad para CD25 y dextrano. A continuación se realizó una segunda incubación con nanopartículas magnéticas recubiertas de dextrano. El tubo se mantiene en el separador magnético durante 5 minutos. El sobrenadante contiene las células CD4⁺CD25⁻. Con el fin de aumentar la pureza de la población, el sobrenadante obtenido se transfirió a otro tubo y se mantuvo 5 minutos más en el imán. Las incubaciones y lavados se realizaron en PBS con un 5 %

de suero bovino fetal (FCS) y 2 mM de EDTA, a temperatura ambiente.

2.2.1.3 Aislamiento de linfocitos CD4⁺CD25⁺. Para el análisis de la actividad reguladora en pacientes de LES las células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ se purificaron a partir de MNC de sangre periférica mediante el *CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell isolation kit* (Miltenyi Biotec, Alemania). En un primer paso se seleccionan negativamente los linfocitos CD4⁺ mediante incubación con anticuerpos anti-CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ y CD235a conjugados con biotina. Seguidamente, las células se incuban con una suspensión de partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-biotina. La suspensión celular se hace pasar a través de una Columna LD (Miltenyi Biotec) situada en un separador magnético (*MidiMACSTM Separator*, Miltenyi Biotec), obteniéndose así la fracción de linfocitos CD4⁺. Para la separación de las células CD25⁺ y CD25⁻ los linfocitos CD4⁺ se incuban con partículas magnéticas unidas a anticuerpos anti-CD25. La suspensión se pasa por una Columna MS (Miltenyi Biotec), situada en el imán *MiniMACSTM Separator* (Miltenyi Biotec) en la que quedan retenidos los linfocitos CD4⁺CD25⁺, que posteriormente se eluyen de la misma. La fracción que no se une a la columna contiene las células CD25⁻, que fueron utilizadas como células respondedoras en los estudios de inhibición en pacientes. Todas las incubaciones y lavados se realizan en PBS con 0.5 % de FCS y 1 mM de EDTA, a 4 °C.

2.2.1.4 Aislamiento de monocitos. Para la generación de células dendríticas se purificaron monocitos de un donante sano, mediante selección magnética positiva, utilizando *MACS CD14 Microbeads* (Miltenyi Biotec). Las MNC previamente aisladas se incuban con anticuerpos anti-CD14 unidos a

partículas magnéticas y se separan haciendo pasar la suspensión celular a través de una Columna LS (Miltenyi Biotec) situada en el separador magnético (*MidiMACS™ Separator*, Miltenyi Biotec). Las células CD14⁺, que quedan retenidas en la columna, se eluyen posteriormente de la misma. La incubación y lavados se realizan en PBS con 0.5 % de FCS y 1 mM de EDTA, a 4 °C.

La pureza de todas las subpoblaciones celulares se determinó mediante citometría de flujo.

2.2.2 Citometría de flujo

2.2.2.1 Tinción extracelular

- **Sangre periférica.** 100 µl de sangre recogida en tubos con EDTA se incubaron durante 30 min a 4 °C en oscuridad con los anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos (Tabla 2.1) o los correspondientes controles isotípicos. Tras este tiempo se lisaron los eritrocitos con 2 ml de BD Pharm Lyse™ (5 min, 4 °C). La sangre lisada se lavó 2 veces con PBS con 1% de FCS (5 min, 1600 rpm) antes de ser analizada.
- **Células aisladas o cultivadas.** Las poblaciones celulares aisladas o las células generadas a partir del cultivo en las distintas condiciones se lavaron y suspendieron en PBS con 1% de FCS y se incubaron con los anticuerpos monoclonales o sus isotipos correspondientes a 4 °C durante 30 minutos. Seguidamente, las células se lavaron dos veces y se analizaron.

2.2.2.2 Tinción intracelular.

Los diferentes procedimientos utilizados para la tinción intracelular comenzaron con el marcaje extracelular de 1.0×10^6 células con los anticuerpos monoclonales correspondientes, siguiendo el protocolo descrito en 2.2.2.1

- **CTLA-4.** Las células se resuspendieron en 1 ml de la solución de fijación (solución A, *Fix and Perm*, Caltag) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS con 1% de FCS se permeabilizaron (solución B, *Fix and Perm*, Caltag) e incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 PE (Tabla 2.2) durante otros 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las células se lavaron dos veces antes de ser analizadas en el citómetro de flujo.
- **FOXP3.** La determinación de la expresión proteica de FOXP3 se realizó mediante el uso del *Human Foxp3 Staining Kit* (eBiosciences). Las células se resuspendieron en 1 ml de la solución fijadora y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Seguidamente las células se lavaron 2 veces en la solución permeabilizadora y se añadió el anticuerpo anti-FOXP3 (30 min, 4°C, oscuridad). En algunos de los experimentos los resultados fueron confirmados utilizando el clon 259D/C7, utilizando para ello el kit de fijación/permeabilización sugerido por el fabricante (*Human FoxP3 Buffer Set*, BD Pharmingen).
- **Citocinas.** Para el análisis de la producción in vitro de las citocinas mediante citometría de flujo, 4×10^6 células se cultivaron previamente en RPMI + 10 % de FCS (2×10^6 células/ml), estimulándose con PMA (20 ng/ml) y ionomicina (500 ng/ml) en presencia de monensin (2 μ M) (todos de Sigma Aldrich) durante 5 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Tras este tiempo las células cultivadas se lavaron y se marcaron extracelularmente, como se explica en 2.2.2.1. Posteriormente se fijaron añadiendo 200 μ l de la solución fijadora CytoFix (BD Biosciences) (20 min, 4 °C, oscuridad). Las células fueron lavadas después con la solución permeabilizadora CytoPerm (BD Biosciences) y

resuspendidas posteriormente en 100 µl de la misma, donde se añadió la cantidad correspondiente de los anticuerpos monoclonales conjugados (Tabla 2.3). Tras 30 min de incubación a 4 °C y en oscuridad, las células se lavaron de nuevo dos veces con la solución permeabilizadora antes de ser analizadas en el citómetro de flujo.

Tabla 2. 1 Anticuerpos utilizados para la detección de marcadores celulares de superficie mediante citometría de flujo.

Especificidad	Fluorocromo	Laboratorio
CD4	PerCP	BD
	APC	BD
	APC-Cy7	BD
CD25	FITC	Miltenyi Biotec
	PE	Miltenyi Biotec
	FITC	BD
	PE-Cy5	BD
CD127	FITC	eBiosciences
	PE-Cy7	eBiosciences
CD69	FITC	Miltenyi Biotec
GITR	FITC	R&D Systems
CD45RO	FITC	BD
	PE	Miltenyi Biotec
	APC	BD
CCR4	PE-Cy7	BD
CCR6	PerCP-Cy5.5	BD

Las muestras se adquirieron en un FACScan, utilizando el programa de análisis CellQuest Pro o en un FACSCanto II, mediante el software de adquisición y análisis FACSDiva 6.1.2 (todos de BD).

Tabla 2. 2 Anticuerpos utilizados para la detección de marcadores intracelulares mediante citometría de flujo.

Especificidad	Fluorocromo	Laboratorio
FOXP3	PE	eBiosciences
	PE	BD
CTLA-4	PE	BD

Tabla 2. 3 Anticuerpos utilizados para la detección de citocinas mediante citometría de flujo.

Especificidad	Fluorocromo	Laboratorio
IL-10	PE	BD
TNF- α	PerCP-Cy5.5	BD
IFN- γ	PerCP-Cy5.5	BD
IL-17	PE	eBiosciences

2.2.3 Criopreservación

Parte de las MNC de los controles y las células dendríticas generadas *in vitro* a partir de monocitos (MDDC) se criopreservaron en nitrógeno líquido para ser usadas posteriormente. Para ello, 5×10^6 MNC o 5×10^5 MDDC se suspendieron en 500 μ l de medio de cultivo, sobre el que se añadió 500 μ l de suero bovino fetal con un 20 % de DMSO (Sigma, Alemania). Para la descongelación, las células se incubaron en baño a 37 °C y se lavaron dos veces en medio RPMI a 4 °C, con objeto de eliminar completamente el DMSO.

2.2.4 Cultivos celulares

2.2.4.1 Generación *in vitro* de células CD25⁺FOXP3⁺ a partir de linfocitos CD4⁺CD25⁻. Los linfocitos CD4⁺CD25⁻ aislados de sangre periférica de cada donante sano se estimularon con

anticuerpos monoclonales frente a CD3 y CD28. Los anticuerpos anti-CD3 (eBioscience, clon OKT3) y anti-CD28 (AbD Serotec, clon YTH913.1) se unieron a placas de 24 pocillos incubándolos durante 12 horas (4 °C), a concentraciones 5 µg/ml y 2.5 µg/ml respectivamente, en PBS. Las placas se lavaron 2 veces con PBS a 4 °C antes de su uso.

Las células fueron cultivadas bajo diferentes condiciones (figura 2.1):

- a) Células sin pretratamiento (*CD25⁺-Control*): estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h, tiempo tras el cual se lavaron y se volvieron a cultivar en los mismos pocillos. Se añadió IL-2 (R&D, Europa; 100 U/ml) y se cultivaron durante 6 días más. Tras este tiempo las células se recogieron, se lavaron, y se re-estimularon, cultivándolas en nuevas placas con anti-CD3 (5 µg/ml) y anti-CD28 (2.5 µg/ml) inmovilizados e IL-2 (100 U/ml). Tras una semana adicional de cultivo, las células se recogieron, se lavaron exhaustivamente y se procedió a realizar los diferentes estudios.
- b) Células pretratadas con dexametasona (*CD25⁺-Dex*): se cultivaron de la misma forma descrita en (a), pero en las 24 horas iniciales las células fueron tratadas con dexametasona (10^{-7} M) (Sigma Aldrich, Alemania).
- c) Células reguladoras generadas con TGFβ (*TGFβ Treg*): se cultivaron de la misma forma descrita en (a), pero en presencia de 10 ng/ml de TGFβ1 (R&D Systems).
- d) Células reguladoras generadas con TGFβ, pretratadas con dexametasona (*TGFβ-Dex Treg*): se cultivaron de la misma forma descrita en (c), pero durante las 24 h iniciales las células estuvieron en presencia, además, de dexametasona (10^{-7} M).

Todos los cultivos se llevaron a cabo en medio RPMI 1640 con 25 mM de HEPES y L-Glutamina (Bio Whittaker, Bélgica) suplementado con un 10 % de FCS (HyClone, Logan, USA), previamente descomplementado (1 hora, 56 °C), 20 U/mL de penicilina y 20 µg/mL de streptomina. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂. La concentración celular para todos los experimentos fue 10⁶ células/ml.

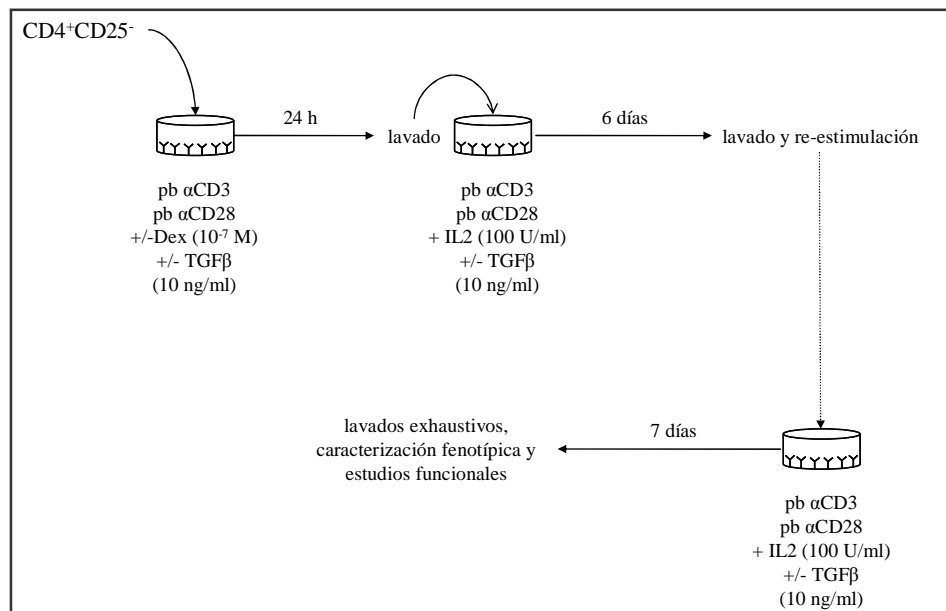


Figura 2.1 Explicación esquemática del tratamiento seguido por las células CD4⁺CD25⁻. (pb αCD3/CD28: anticuerpos anti CD3 y CD28 inmovilizados en placa).

2.2.4.2 Generación de células dendríticas a partir de monocitos (MDDC). Los monocitos aislados como se describe en el apartado 2.2.1.4 se cultivaron durante 7 días en placas de 24 pocillos, a una concentración celular de 5×10⁵ células/ml, en presencia de 70 ng/ml de GM-CSF y 35 ng/ml de IL-4 (R&D Systems Europa). Las células dendríticas así obtenidas se maduraron durante dos días con TNFα (50 ng/mL) (R&D Systems Europa). Tras la maduración se mantuvieron

congeladas en alícuotas hasta su uso, tal y como se describe en el apartado 2.2.3.

2.2.4.3 Análisis de la proliferación. Para determinar la actividad funcional de las células CD4⁺CD25⁺ aisladas de pacientes o de las células CD25⁺ generadas *in vitro* se midió su capacidad para inhibir la proliferación de células efectoras. También se analizó la capacidad de estas células para responder al estímulo con PHA. Para ello se emplearon dos métodos distintos:

- **Incorporación de timidina tritiada.** La actividad reguladora de las células CD4⁺CD25⁺ de los pacientes de LES se determinó mediante incorporación de timidina tritiada. 5.0×10^4 linfocitos CD4⁺CD25⁻ por pocillo fueron utilizados en este caso como células efectoras (respondedoras) y se estimularon con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos (MDDC) (3500 células/pocillo). Las células CD4⁺CD25⁺ se añadieron a un ratio 1:2 (2.5×10^4 CD4⁺CD25⁺ : 5.0×10^4 CD4⁺CD25⁻). Como control, 5.0×10^4 células CD4⁺CD25⁻ fueron cultivadas solas, con y sin MDDC. Tras cuatro días de cultivo se añadió 1 μ Ci de [³H]timidina a cada pocillo (37 KBq/pocillo). La incorporación de timidina tritiada se determinó 18 horas después en un contador de emisión β .

Para evaluar la respuesta de los distintos tipos de células al estímulo con PHA se cultivaron 5.0×10^4 células/pocillo, con y sin PHA (2 μ g/ml), en presencia de 5.0×10^4 células MNC alogénicas irradiadas (3000 Cy) como células *feeder*. Al cuarto día de cultivo se añadió 1 μ Ci de [³H]timidina a cada pocillo (37 KBq/pocillo). Tras 18 horas se determinó la proliferación celular en un contador de emisión β . Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

- **Dilución de la señal de CFSE.** La actividad reguladora de las células CD25⁺ generadas *in vitro* se determinó mediante

citometría de flujo. Las células efectoras se tiñeron intracelularmente con CFSE (Fluka Sigma, Alemania). Para ello se suspendieron en 250 µl de PBS con 0.5 % de BSA, sobre el que se añadieron 250 µl de una disolución 5 µM de CFSE en PBS con BSA 0.5 %. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C en oscuridad. La tinción se detuvo sobre hielo, añadiendo 5 ml de medio RPMI a 4 °C (5 minutos), tras lo cual las células se lavaron 3 veces en RPMI y se co-cultivaron con los distintos tipos de células generadas. Al cuarto día de cultivo se recogieron, se lavaron dos veces con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo.

2.2.5 Análisis de la expresión génica. Se realizó mediante RT-PCR a tiempo real.

2.2.5.1 Extracción de RNA mensajero. El RNA mensajero (mRNA) se extrajo de las células en cultivo o de muestras de sangre procedente de pacientes y controles sanos (3 ml de sangre recogida en tubos con EDTA). La lisis celular se hizo con la solución estabilizadora de ácidos nucleicos *RNA/DNA Stabilization reagent for Blood/Bone Marrow* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El lisado celular se congeló a -20 °C hasta su uso. El mRNA se aisló mediante separaciones magnéticas usando el *mRNA isolation kit for blood/bone marrow* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. En un primer paso, se separan todos los ácidos nucleicos, mediante su unión a partículas magnéticas de vidrio. Tras varios lavados, los ácidos nucleicos se eluyen de las partículas incubando 5 minutos a 70 °C y se separan mediante un imán. Los ácidos nucleicos así separados se incuban con oligos(dT) unidos a biotina y con unas segundas partículas magnéticas conjugadas con streptavidina (5 minutos, 37 °C). De esta forma, el mRNA queda unido a las partículas magnéticas, las

cuales se separan con el imán y se lavan. Finalmente, las partículas se resuspenden en 12 μ l de agua destilada y se eluye el mRNA por incubación a 70 °C (2 minutos). El líquido, que contiene el mRNA, se separa de las partículas con el imán y se transfiere a un nuevo tubo. El mRNA aislado (poli A⁺) se mantuvo congelado a -80 °C hasta su uso.

2.2.5.2 Síntesis de cDNA. La transcripción reversa se realizó mediante el uso del kit *Reverse-iT™ RTase Blend* (ABgene, Reino Unido), para el caso del FOXP3 o *RT² First Strand Kit* (SABiosciences) para STAT3, STAT4, IL-6R e IL-12R (β 1 y β 2). El cDNA obtenido se guardó a -20 °C hasta su uso.

2.2.5.3 PCR. La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante PCR a tiempo real utilizando SYBR Green como agente para la detección. El SYBR Green es un fluorocromo que se intercala en el DNA de doble cadena. El termociclador detecta la fluorescencia al final de cada ciclo de PCR. La intensidad de fluorescencia en este punto es, por tanto, proporcional a la cantidad de producto de PCR formado en cada ciclo. La cuantificación de la cantidad inicial de mRNA se basa en el principio de que el número de copias originales es inversamente proporcional al número de ciclos de PCR necesarios para alcanzar la fase exponencial. La expresión génica de FOXP3 se cuantificó mediante el kit de amplificación y marcaje *FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Molecular Biochemicals) en un termociclador *Light Cycler* (Roche). Las unidades obtenidas de FOXP3 se relativizaron respecto al gen constitutivo β -actina. En todas las amplificaciones se introdujo además un control negativo sin cDNA. La cuantificación de la expresión génica de STAT3, STAT4, IL-6R e IL-12R se realizó mediante *RT² SYBR® Green qPCR Master Mix* (SA Biosciences), en un termociclador

ABI7900HT. Los niveles de expresión de calcularon respecto a CD4, utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.2.6 Cuantificación de citocinas

2.2.6.1 ELISA. La concentración de TGF- β 1 sérico se determinó usando el *Human TGF- β 1 ELISA Set* (BD OptEIA™). Las muestras de suero se activaron previamente con HCl 1N (60 min, 4 °C) y luego se neutralizaron con NaOH 1N. Los pocillos de las placas se incubaron con el anticuerpo de captura, en tampón carbonato 0.1 M (Na₂CO₃ y NaHCO₃, pH 9.6) (toda la noche, 4 °C). Tras lavar los pocillos (PBS/Tween-20, 0.05 %), se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con PBS+10 % FCS. Seguidamente se añadieron los estándares y las muestras y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar extensivamente los pocillos se añadió el reactivo de detección (anti-TGF- β 1 biotilnado y streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano). Como sustrato se utilizó tetrametilbenzidina (TMB). La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N, tras lo cual se determinó la absorbancia a 450 nm. El límite de detección del ELISA es 11.9 ng/ml.

2.2.6.2 Cytometric Bead Array (CBA). Las concentraciones séricas de IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- α e IL-17A se obtuvieron utilizando un ensayo citométrico multiplex. Este tipo de técnicas se basa en el mismo principio que el ELISA tipo sandwich, pero en este caso el soporte sobre el que se produce la reacción antígeno-anticuerpo son bolitas fluorescentes. Las bolitas recubiertas de cada uno de los anticuerpos (con diferentes especificidades) poseen distintas intensidades de fluorescencia, de tal manera que pueden ser clasificadas en un dot plot red vs far-red (APC vs APC-Cy7). Esto permite el análisis de un gran número de analitos en un

volumen de muestra muy pequeño (típicamente 25 o 50 μ l). La detección de la cantidad de cada una de las citocinas se realiza mediante el uso de anticuerpos específicos conjugados con PE. Así, una mayor intensidad de fluorescencia en este canal indica una mayor concentración del analito. Debido a que los niveles séricos esperados de algunas citocinas eran muy pequeños, en algunos casos se utilizó una variante diseñada para proporcionar una mayor sensibilidad (*BD™ Cytometric Bead Array Enhanced Sensitivity Flex*), que incluye un paso adicional en el que se añade un reactivo que incrementa la señal de la PE (tabla 2.4).

Tabla 2. 4 Citocinas determinadas en suero mediante Flex Set Cytometric Bead Arrays.

Citocina		Límite de detección
GM-CSF	Human GM-CSF Flex Set	0.2 pg/ml
IL-8	Human IL-8 Flex Set	1.2 pg/ml
IFN-α	Human IFN- α Flex Set	1.5 pg/ml
IL-1β	Human IL-1 β Enhanced Sensitivity Flex Set	48.4 fg/ml
IL-6	Human IL-6 Enhanced Sensitivity Flex Set	68.4 fg/ml
IL-17A	Human IL-17 Enhanced Sensitivity Flex Set	26.1 fg/ml

2.2.7 Análisis estadístico. Los resultados procedentes del análisis fenotípico de las células de pacientes y controles y del estudio de producción de citocinas *in vitro* se expresan como mediana (amplitud intercuartil). En estos casos las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test U de Mann-Whitney. Las correlaciones se efectuaron mediante el test de Spearman. En los experimentos en los que se confirmó la normalidad de las variables (mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov) los resultados se expresan como media (desviación estándar). En estos casos la comparación de los valores medios se hizo

mediante la prueba T de Student. Cuando el diseño del experimento lo requirió las diferencias entre las medias se evaluaron mediante un test pareado.

En los estudios de la capacidad de inhibición de la proliferación mediante dilución de CFSE el porcentaje de inhibición se calculó, en cada experimento, de la siguiente forma:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left[\frac{\% \text{ de células que proliferaron en el cocultivo} - \% \text{ de células que proliferaron en el control negativo}}{\% \text{ de células que proliferaron en el control positivo} - \% \text{ de células que proliferaron en el control negativo}} \times 100 \right]$$

Control negativo: células mononucleares sin estimular

Control positivo: células mononucleares estimuladas con PHA.

En los estudios de funcionalidad de las células CD4⁺CD25⁺ en pacientes de LES, la inhibición de la proliferación se calculó, para cada experimento, de la siguiente forma:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left[\frac{\text{cpm del cocultivo} - \text{cpm del control negativo}}{\text{cpm del control positivo} - \text{cpm del control negativo}} \times 100 \right]$$

Control negativo: células CD4⁺CD25⁻ sin estimular.

Control positivo: células CD4⁺CD25⁻ estimuladas con células dendríticas derivadas de monocitos alogénicos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SSPS 15.0 (SPSS Inc.). Los gráficos se dibujaron con el SSPS 15.0 (SPSS Inc) o el GraphPad Prism software (version 4.0).

CAPÍTULO 3

EFFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FOXP3 Y LA ACTIVIDAD REGULADORA

3.1. INTRODUCCIÓN

Las células reguladoras ejercen una tolerancia activa que es necesaria para controlar la respuesta inmune frente a antígenos extraños, así como para mantener la tolerancia frente a los componentes de lo propio y elementos extraños no dañinos. Existen muchas evidencias de que las células T CD4⁺ reguladoras (Treg) juegan en un papel muy importante en las enfermedades autoinmunes. En el LES se han realizado numerosos trabajos que abordan el análisis de las células Treg y muchos de ellos han demostrado que la mayor parte de los pacientes de LES presentan alguna alteración en la función de estas células (149). Como resultado de todos estos estudios –y otros realizados en el contexto de otras enfermedades autoinmunes o de los trasplantes– la transferencia adoptiva de células Treg es considerada una forma efectiva para tratar un gran número de enfermedades de base inmunológica. En la actualidad sólo existe un método que permite aislar células Treg en condiciones GMP, basado en la expresión de CD25 y CD127 (150). Sin embargo, este método podría dar lugar a la presencia de células activadas, de fenotipo similar. Por otro lado, el número de células que se puede obtener mediante este método es muy pequeño, por lo que generalmente son necesarios pasos previos de expansión *in vitro*. Estos hechos hacen necesario el desarrollo de nuevos protocolos que permitan expandir o generar células Treg *in vitro*.

Existen muchas evidencias de que los corticoides pueden ser capaces de actuar sobre la población de células reguladoras. El tratamiento con corticoides aumenta el número de células Treg y los niveles de expresión de FOXP3 en el asma (151), LES (123, 124, 152) y pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune (153). *In vitro*, la dexametasona es capaz de aumentar la expresión de CD25 (154) y FOXP3 en linfocitos T activados (151), mientras que en modelos murinos la inyección intraperitoneal de este corticoide aumenta la proporción de células CD4⁺CD25⁺ en los ganglios linfáticos (125). Otras

evidencias del efecto de los corticoides sobre la expresión de FOXP3 y CD25 provienen de los estudios realizados durante el embarazo, en los que se relaciona el aumento en el número de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ con el incremento de los niveles de estrógeno (155, 156).

Sin embargo, hasta la fecha, el mecanismo a través del cual los corticoides ejercen este efecto es desconocido. Podría ser debido a la expansión de células CD25⁺FOXP3⁺ o a su generación a partir de células CD25⁻FOXP3⁻. Por otro lado, los corticoides podrían inducir la muerte selectiva de células CD25⁻FOXP3⁻, aumentando así la frecuencia relativa de las células CD25⁺FOXP3⁺ (125).

En este capítulo se estudia, en primer lugar, el efecto de la dexametasona sobre la expresión de FOXP3 y la actividad reguladora tanto en linfocitos T CD4⁺ activados como en células reguladoras generadas *in vitro* con TGFβ. Seguidamente se analiza el efecto de los glucocorticoides sobre la función *ex vivo* de células CD4⁺CD25^{high}, cuantificando la capacidad supresora de las células Treg de pacientes de LES con y sin tratamiento con prednisona.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Expresión de FOXP3 y otros marcadores de células T reguladoras en células CD4⁺CD25⁻ tratadas con dexametasona

Células CD4⁺CD25⁻ (pureza > 99%, Fig. 3.1, izquierda) aisladas de sangre periférica procedente de donantes sanos se cultivaron a 10⁶ células/ml y se estimularon con pb anti-CD3/28 en presencia o ausencia de dexametasona durante las primeras 24 horas. Como se muestra en la figura 3.1, pasado este tiempo la dexametasona inhibió la expresión de marcadores de activación como CD25, CD69 y evitó el descenso de la expresión de CD127, efecto ya mostrado por Franchimont et al. (157).

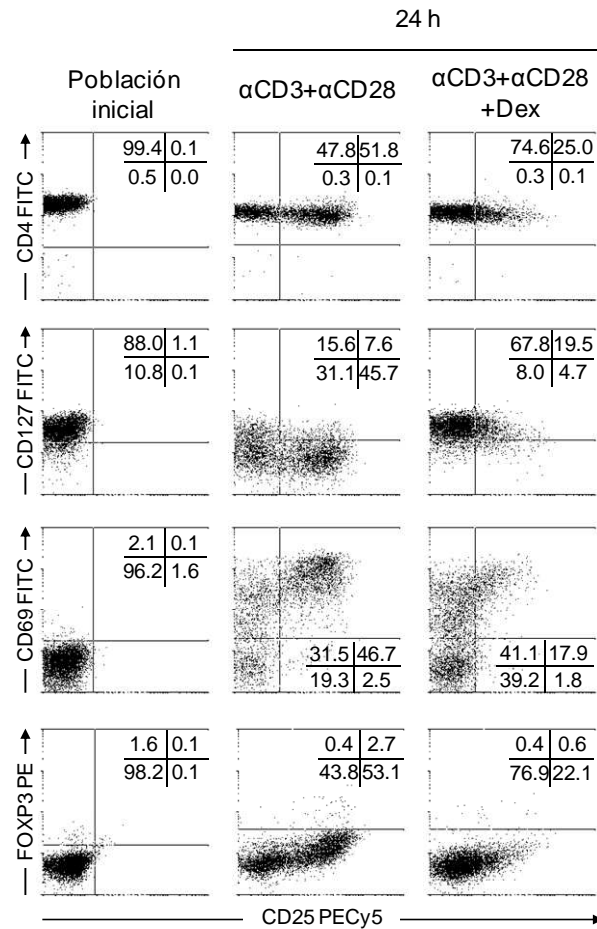


Figura 3.1 Expresión de CD4, CD25, CD127, CD69 y FOXP3 en células CD4⁺CD25⁻ (población inicial) y tras 24 horas de tratamiento con pb anti-CD3/CD28 en ausencia o presencia de 10⁻⁷ M de dexametasona (Dex). Los dot plots muestran los resultados de un experimento representativo (n=3). Los números representan el porcentaje de células en cada cuadrante.

Tras el pretratamiento, las células se lavaron y se siguieron cultivando con anti-CD3/28 e IL-2 (100 U/ml). Seis días después se re-estimularon y se cultivaron una semana más. Las células fueron contadas a diferentes tiempos (Fig. 3.2a) observándose que el número de veces que se expandieron fue comparable en los cultivos realizados en ausencia o presencia de dexametasona (media ± SD: 4.0 ± 1.1 vs 5.2 ± 0.8; n=3).

Tras las dos semanas de cultivo las células se caracterizaron fenotípicamente mediante citometría de flujo (Fig. 3.2b y c). La mayoría

de las células expresaban CD25, GITR y CD45RO, aunque el nivel de expresión de CD25 por célula (MFI) fue ligeramente mayor en las células tratadas con dexametasona (*CD25⁺-Dex*) que en las que no habían recibido este tratamiento (*CD25⁺-Control*) (1864.1 ± 497.5 vs 1452.1 ± 521.9 ; $n=10$; n.s.). Sin embargo, el efecto más notable de la dexametasona fue el incremento en la expresión de FOXP3, tanto en los valores de MFI (59.9 ± 29.5 vs 29.4 ± 10.6 ; $n=10$; $p<0.05$) como en el porcentaje de células FOXP3 positivas ($60.1\% \pm 21.1$ vs $32.6\% \pm 12.8$; $n=10$; $p<0.001$) (Fig. 3.2b). El análisis de otros marcadores de activación y diferenciación (Fig. 3.2c) demostró que los cultivos no tratados con dexametasona mostraban mayor expresión del marcador de activación CD69 (porcentaje de células positivas: $58.3\% \pm 19.0$ vs $36.6\% \pm 16.3$; $n=10$; $p<0.05$; MFI: 130.5 ± 65.2 vs 59.1 ± 39.7 $n=10$; $p<0.05$) que las células que habían sido tratadas con el corticoide. Además, las células *CD25⁺-Dex* expresaron niveles de CD4 menores (MFI CD4: 85.9 ± 42.5 vs 106.4 ± 41.3 ; $n=10$; n.s.) y niveles más altos de CTLA-4 intracelular (MFI, 125.4 ± 42.4 vs 83.3 ± 21.9 ; $n=4$; n.s.) que las células *CD25⁺-Control*. En lo referente a la expresión de CD127, no se encontraron diferencias entre las células *CD25⁺-Control* y las *CD25⁺-Dex*. Estos resultados sugieren que las células tratadas con dexametasona muestran un fenotipo comparable al que se le atribuye a las células reguladoras naturales ($CD4^{\text{low}} CD25^{\text{high}} CD69^{\text{low}} GITR^+ CD127^{-/\text{low}} iCTLA4^+ FOXP3^+$).

3.2.2 La dexametasona incrementa la expresión de FOXP3 en células Treg generadas *in vitro* con TGF β

Para el análisis del efecto de la dexametasona sobre la expresión de FOXP3 en células Treg generadas *in vitro* se purificaron linfocitos $CD4^+CD25^-$ y se estimularon con pb anti-CD3/CD28, IL-2 y TGF β durante 14 días, con o sin tratamiento previo de dexametasona (células *TGF β -Dex Treg* o *TGF β Treg* respectivamente).

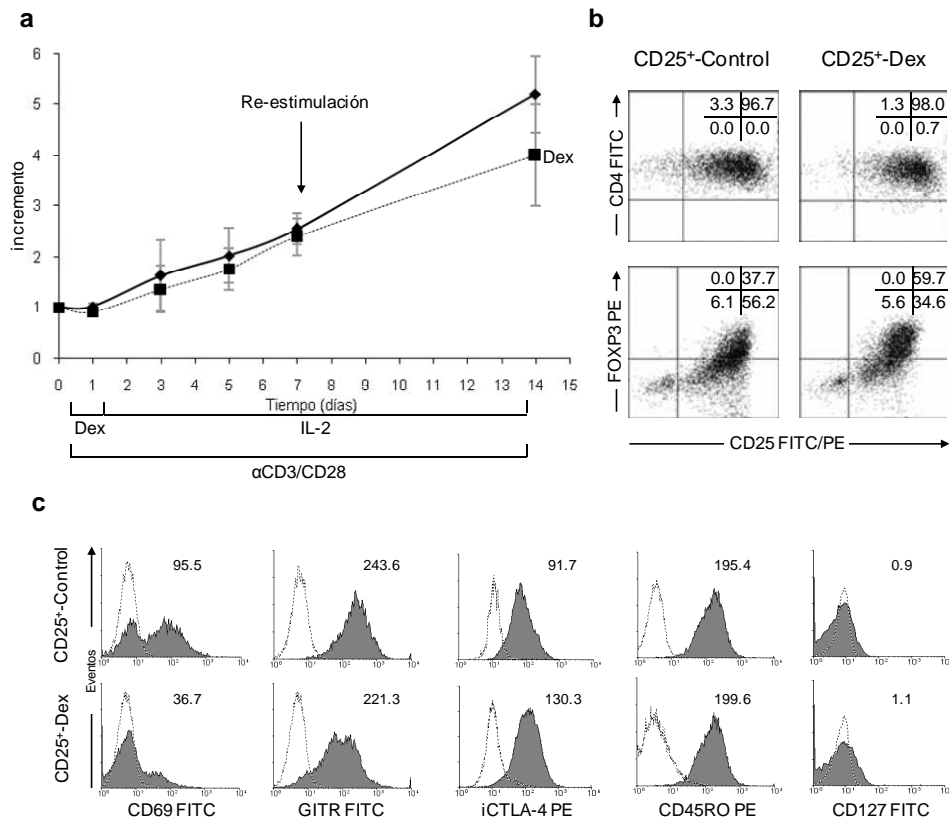


Figura 3.2 Efecto de la dexametasona sobre las células CD4⁺CD25⁻ activadas y expandidas durante 2 semanas. (a) Expansión de las células CD4⁺CD25⁻ (10⁶ células/ml) estimuladas con pb anti-CD3/CD28 e IL-2 durante 14 días con pretratamiento de dexametasona (línea de puntos) o sin él (línea sólida). A día 7 las células se re-estimularon. El número de células de cada cultivo se contó a los tiempos indicados. Las curvas de expansión representan media (SD) de tres experimentos diferentes. (b) Expresión de CD25 y FOXP3 en las células tras 14 días de expansión, con tratamiento inicial de dexametasona (CD25⁺-Dex) o sin él (CD25⁺-Control). Los números mostrados en los dot plots indican el porcentaje de células en cada cuadrante. (c) Expresión de marcadores de activación y marcadores típicos de las células Treg en las células CD25⁺-Control y CD25⁺-Dex tras 14 días de cultivo. Los números indican los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI). Los experimentos independientes se llevaron a cabo con donantes distintos.

La expresión de CD25 y FOXP3 se analizó a las 2 semanas en ambos tipos celulares. En la figura 3.3 se observa que las células *TGFβ* Treg mostraron niveles de expresión de FOXP3 similares a los de las células Treg aisladas de sangre periférica (nTreg). El pretratamiento con dexametasona incrementó significativamente el número de células FOXP3⁺ (77.5 ± 9.4% vs 61.4 ± 5.8%; n=5; p<0.05) y los valores de

intensidad media de fluorescencia (124.1 ± 18.0 vs 90.9 ± 20.3 ; $n=5$; $p = 0.05$).

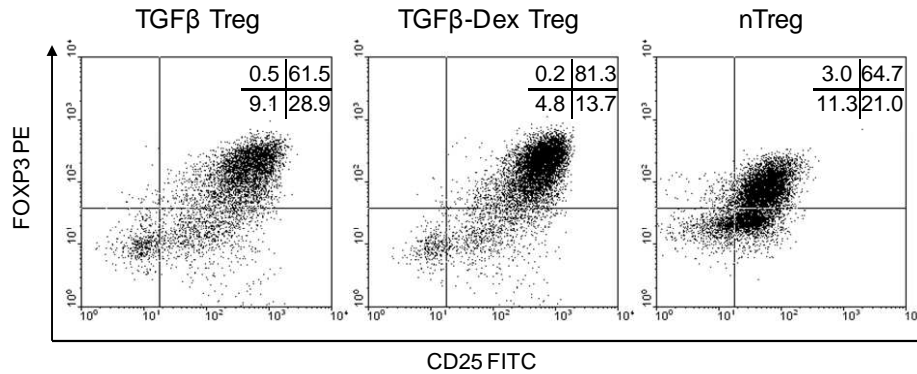


Figura 3.3 Expresión de FOXP3 en células nTreg y células Treg generadas in vitro con TGFβ. Los linfocitos CD4⁺CD25⁻ se cultivaron con anti-CD3/CD28, IL-2 y TGFβ durante 2 semanas en presencia (*TGFβ-Dex Treg*) o ausencia (*TGFβ Treg*) de dexametasona durante las primeras 24 horas. Las células CD4⁺CD25^{high} (nTreg) se aislaron de donantes sanos. Todas las células Treg fueron marcadas con CD25 FITC y FOXP3 PE (clon PCH101). Los números en los dot plots indican el porcentaje de células en cada cuadrante. Se muestra el resultado de un experimento representativo ($n=5$).

Estos resultados fueron confirmados utilizando otro anticuerpo monoclonal (clon 259D/C7; BD) ya que la sensibilidad y especificidad de algunos anticuerpos anti-FOXP3 utilizados de forma habitual en los laboratorios de investigación han sido cuestionadas (158)(159).

3.2.3 Efecto de la dexametasona en la expresión génica de FOXP3

Los resultados obtenidos a nivel de proteína se corroboraron mediante análisis de expresión génica. Se aisló el mRNA de los linfocitos CD25⁻ y de las células *CD25⁻-Control*, *CD25⁻-Dex*, *TGFβ Treg* y *TGFβ-Dex Treg* a diferentes tiempos durante el proceso de diferenciación. La expresión génica de FOXP3 se cuantificó mediante RT-PCR a tiempo real. El nivel de expresión génica de las células T CD4⁺CD25^{high} aisladas de sangre periférica se utilizó como control positivo (Fig. 3.4). Los resultados mostraron que, tras las primeras 24 horas de cultivo, el tratamiento con dexametasona tendió a aumentar el número de transcritos de FOXP3 a todos los tiempos y en todas las condiciones testadas. Los niveles más

altos de expresión génica se encontraron en las células *TGFβ-Dex Treg*, resultado que coincide con lo observado en los experimentos en los que se testó la expresión proteica tras 14 días.

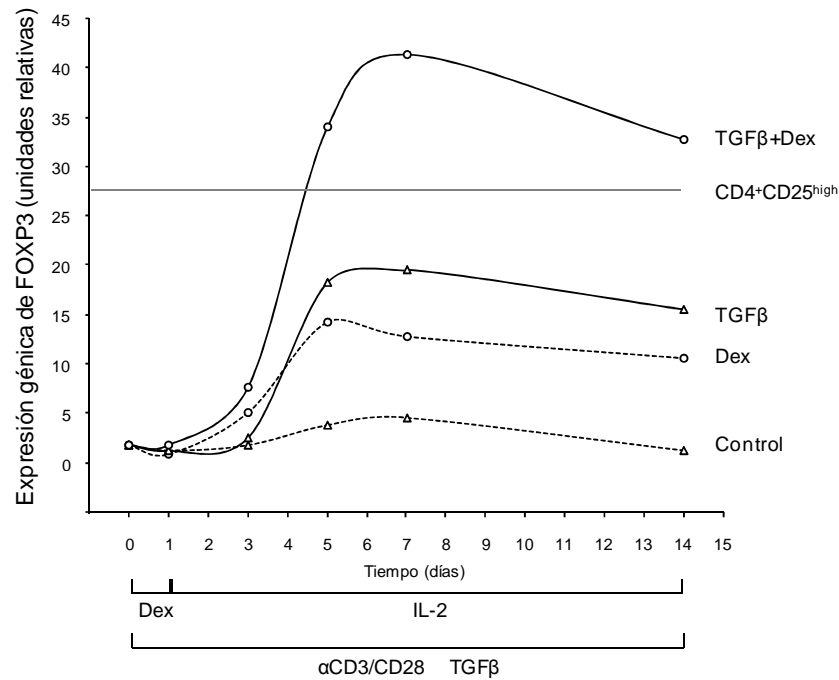


Figura 3.4 La dexametasona incrementa la expresión génica de FOXP3. Las células $CD4^+CD25^-$ se trataron con anti- $CD3/CD28$ e IL-2 en presencia o ausencia $TGF\beta$ y dexametasona. A los tiempos indicados (0, 1, 3, 5, 7 y 14 días) se recogieron las células y se cuantificaron los niveles de mRNA de FOXP3 mediante RT-PCR a tiempo real. La línea horizontal representa el nivel de expresión génica encontrado en las células $CD4^+CD25^{high}$ aisladas de sangre periférica. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos diferentes llevados a cabo con células de donantes distintos.

3.2.4 Estudio de la funcionalidad de las células generadas con dexametasona

La actividad funcional de las células diferenciadas en presencia de dexametasona se determinó mediante ensayos de inhibición de la proliferación celular. Las células efectoras (MNC autólogas) previamente congeladas, se marcaron intracelularmente con CFSE, se estimularon con PHA y se cultivaron solas, con células $CD4^+CD25^{high}$ (nTreg) autólogas aisladas de sangre periférica (como control positivo de supresión), o en presencia de células $CD25^-$ -Control, $CD25^-$ -Dex, $TGF\beta$ Treg o $TGF\beta$ -Dex Treg a diferentes ratios (efectoras: $CD25^+$ 4:1, 2:1 y

1:1). Como se muestra en la figura 3.5, las células *CD25⁺-Control* y *CD25⁺-Dex* inhibieron la proliferación celular de forma apenas perceptible en comparación con las nTreg. Sin embargo, las células *TGFβ Treg* y *TGFβ-Dex Treg* fueron capaces de inhibir la proliferación celular de forma dosis dependiente. Se obtuvieron resultados similares cuando se analizó la inhibición celular mediante incorporación de timidina tritiada.

El análisis simultáneo de la expresión de FOXP3 y la capacidad reguladora permitió observar la ausencia de correlación entre estos dos parámetros, ya que el pretratamiento con dexametasona sólo incrementó ligeramente la capacidad supresora en las células *TGFβ Treg* (40.3 % ± 13.5 vs 46.3 % ± 11.1; n=9; n.s., ratio 1:1), mientras que su efecto en la expresión de FOXP3 fue muy notable. De hecho el porcentaje de células FOXP3⁺ dentro de las células *CD25⁺-Dex* fue similar al encontrado en las *TGFβ Treg* cells (60.1 % ± 21.1 vs 61.4 % ± 5.8, n.s.), pero sólo las *TGFβ Treg* fueron supresoras (11.4 ± 13.5 % vs 40.3 ± 9.5 %, ratio 1:1; p=0.03). (Fig. 3.6a)

Estos datos sugieren que el tratamiento con dexametasona incrementa la expresión de FOXP3 sin ser capaz de producir un aumento significativo en la capacidad reguladora.

Puesto que la anergia es una de las características funcionales de las células Treg, seguidamente se analizó la habilidad para proliferar en respuesta a PHA de las poblaciones expandidas (Fig. 3.6b). Las cuatro poblaciones generadas, así como células *CD4⁺CD25⁻* y *CD4⁺CD25^{high}* aisladas de sangre periférica, fueron estimuladas con PHA en presencia de MNC autólogas irradiadas (nodrizas) durante 5 días. La proliferación se determinó mediante incorporación de ³H-timidina. Todas las células *CD25⁺* generadas, así como las células nTreg purificadas de sangre, fueron hiporrespondedoras (Fig. 3.6b).

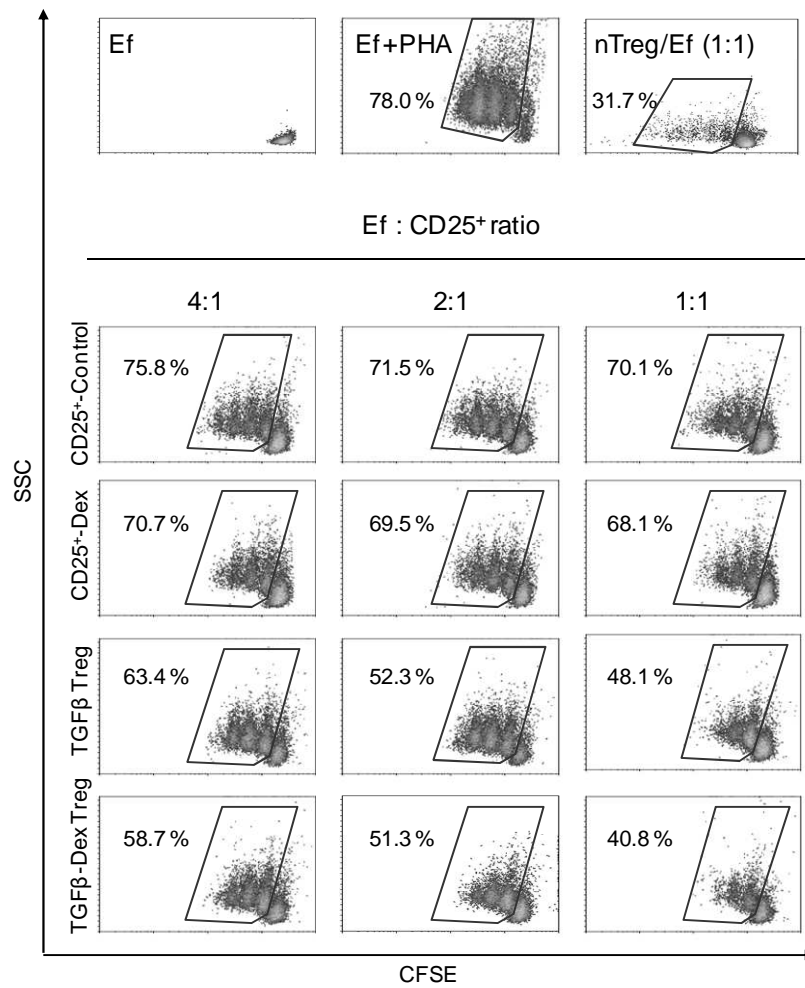


Figura 3.5 Capacidad las células CD25⁺-Control, CD25⁺-Dex, TGFβ Treg y TGFβ-Dex Treg para suprimir la proliferación. Las células MNC autólogas (células efectoras, Ef) se marcaron con CFSE y se cultivaron durante 4 días. Las células Ef se estimularon con PHA y se co-cultivaron con diferentes ratios Ef:CD25⁺. Se cultivaron células efectoras con células nTreg a ratio 1:1 (control positivo de supresión, dot plot superior, derecha). El dot plot superior izquierdo muestra las células Ef cultivadas sin estímulo, mientras que en el medio se muestran las células efectoras cultivadas solas y estimuladas con PHA. Los números indican el porcentaje de células proliferantes.

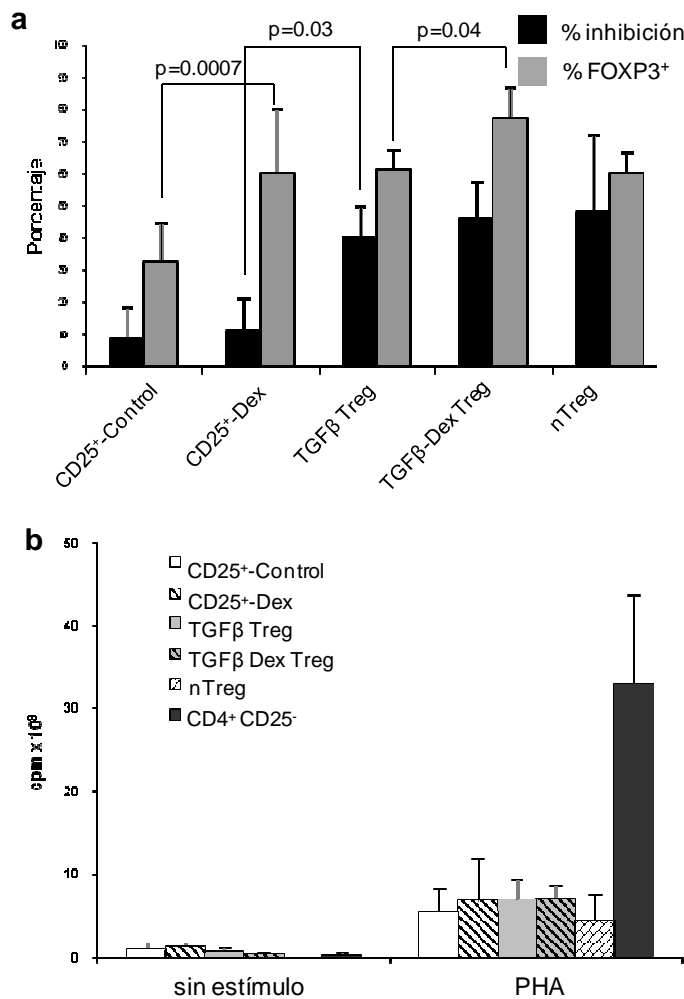


Figura 3.6 (a) Porcentaje de células FOXP3⁺ y porcentaje de inhibición de la proliferación (ratio 1:1) de las poblaciones *CD25⁺-Control*, *CD25⁺-Dex*, *TGFβ Treg*, *TGFβ-Dex Treg*, *nTreg* y *CD4⁺CD25⁻*. Las barras representan media (SD) de al menos 5 experimentos independientes. (b) Capacidad proliferativa de las células *nTreg* y de las 4 poblaciones de células *CD25⁺* generadas. Las células *CD25⁺-Control*, *CD25⁺-Dex*, *TGFβ Treg*, *TGFβ-Dex Treg*, *nTreg* o *CD4⁺CD25⁻* (5.0×10^4) se estimularon con PHA en presencia de 5.0×10^4 células MNC alogénicas irradiadas. La proliferación se determinó mediante incorporación de ³H-timidina. Los datos representan la media (SD) de 3 experimentos distintos.

3.2.5 Efecto del tratamiento con glucocorticoides en la funcionalidad de las células CD4⁺CD25^{high} de pacientes de LES

Numerosos resultados han demostrado que los pacientes bajo tratamiento con corticoides tienen un mayor número de células CD4⁺CD25^{high} (123, 151-153) y mayor expresión de FOXP3 (124, 151, 153). Con el fin de determinar si el tratamiento con estos agentes inmunosupresores influye en la actividad de las células Treg se midió la

habilidad de las células CD4⁺CD25^{high} procedentes de pacientes de LES tratados con y sin glucocorticoides para suprimir la proliferación. Para ello se seleccionaron 11 pacientes de LES con enfermedad inactiva: seis bajo tratamiento con antipalúdicos (% de nTreg: 4.45 ± 0.83) y 5 bajo tratamiento con antipalúdicos y corticoides (5.70 ± 3.69). Las células CD4⁺CD25⁻ de cada uno de los pacientes se estimularon con MDDC alogénicas y se cultivaron solas o en presencia de células CD4⁺CD25^{high} autólogas (ratio 2:1). La proliferación se determinó midiendo la incorporación de ³H-timidina. Como se muestra en la figura 3.7 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la función inhibitoria de las células CD4⁺CD25^{high} entre los dos grupos de pacientes.

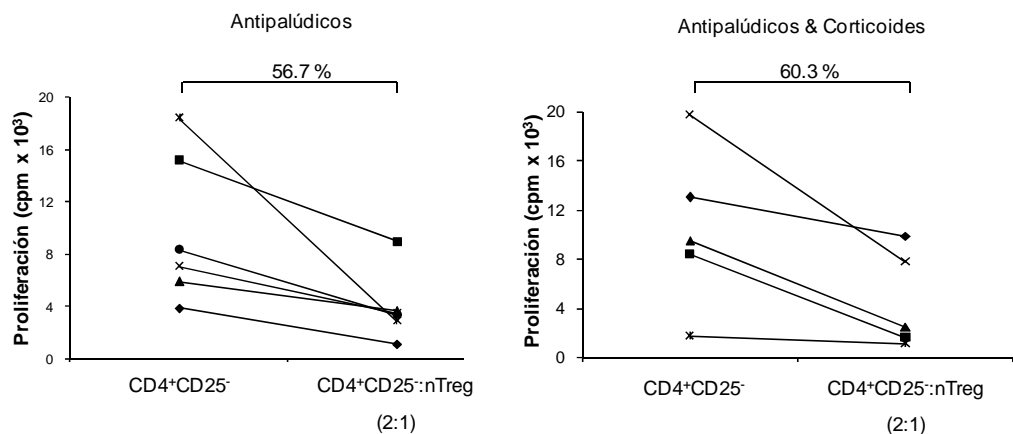


Figura 3.7 Función supresora de las células nTreg de pacientes de LES. Los linfocitos CD4⁺CD25⁻ se aislaron de sangre periférica de pacientes de LES tratados con y sin corticoides y se estimularon con MDDC alogénicas en presencia o ausencia de células CD4⁺CD25^{high} autólogas. La proliferación se determinó mediante incorporación de ³H-timidina. El porcentaje de inhibición se calculó para cada paciente. El valor medio para cada grupo de pacientes se muestra en la figura.

3.3 DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo demuestran que la dexametasona es capaz de aumentar significativamente la expresión génica y proteica de FOXP3 en linfocitos CD4⁺CD25⁻ activados. Aunque el tratamiento con dexametasona se realizó únicamente durante las primeras 24 horas, el

aumento en la expresión se mantuvo al menos dos semanas, lo cual indica un prolongado efecto de la dexametasona sobre la expresión de FOXP3. *In vitro*, Karagiannidis *et al.* (151) mostraron, igualmente, la capacidad de la dexametasona para aumentar la expresión de FOXP3 a nivel de mRNA en linfocitos CD4⁺CD45RA⁺ humanos activados a través del complejo TCR/CD3. Sus resultados se confirmaron *in vivo* en pacientes de asma. Aquellos que se encontraban bajo tratamiento sistémico con corticoides mostraban una mayor expresión de mRNA de FOXP3 en sus linfocitos CD4⁺ de sangre periférica. De forma similar, nuestro grupo de investigación (124) mostró que los pacientes de lupus bajo tratamiento con corticoides presentaban una mayor expresión génica de FOXP3 en sangre periférica que los pacientes que se encontraban bajo otros tratamientos. Ling Y *et al.* (153) determinaron el número de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ en pacientes de trombocitopenia púrpura inmune, antes y después de la administración de dexametasona, y observaron que este tratamiento ocasionaba un aumento en el porcentaje de linfocitos CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Polanczyk *et al.* (160) estudiaron el efecto de los estrógenos *in vitro* sobre células CD4⁺CD25⁻ murinas, observando un aumento en la expresión de FOXP3 (mRNA) y en el porcentaje de células CD25⁺. Sus resultados fueron confirmados *in vivo*, mostrando que tanto la gestación como la administración de estrógenos producían un aumento similar de la expresión de FOXP3 (155). Examinando estos resultados y otros, parece existir consenso acerca de la capacidad de los corticoides para aumentar la expresión de FOXP3.

En este trabajo se ha encontrado que, además del aumento en los niveles de FOXP3, el pretratamiento con dexametasona genera células con un fenotipo comparable al de las células reguladoras naturales. Aunque todas las células, tanto las pretratadas con el corticoide como las control, resultaron ser CD25⁺ CD127^{-/low} GITR⁺ iCTLA-4⁺, un fenotipo esperable en las células activadas, se encontró una menor

expresión de CD4 y CD69 y mayor de CD25 y iCTLA-4 en las células pretratadas con el corticoide con respecto a las células cultivadas en ausencia del mismo. Por tanto, el fenotipo encontrado en las células pretratadas con dexametasona es comparable al de las células reguladoras naturales. Concretamente, la menor expresión de CD69 mostrada por las células generadas con el corticoide en comparación con las células control parece indicar que estas células no son linfocitos activados. FOXP3 es capaz de activar la transcripción de multitud de genes, entre los que se encuentran genes que codifican proteínas que se expresan de forma constitutiva en las células reguladoras naturales, como CD25, GITR, y CTLA-4 (82). En este sentido, es posible que la elevada expresión de FOXP3 encontrada en las células generadas con dexametasona sea la causante de la generación de este fenotipo, mediante su efecto, directo o indirecto, sobre los promotores de los citados genes.

Recientemente se ha propuesto el uso de CD127 (la cadena α del receptor de la IL-7) como marcador de células reguladoras naturales. La correlación negativa entre la expresión de FOXP3 y CD127 en linfocitos CD4⁺ CD25⁺ de sangre periférica ha sido demostrada al menos por dos grupos de investigación (40, 41). En los experimentos descritos en este capítulo se ha demostrado que la expresión de CD127 desciende dramáticamente con la activación a través del TCR (de hecho, esto ocurre en las primeras 24 horas) y que la expresión de CD25 se incrementa, hasta el punto de que la práctica totalidad de las células obtenidas resultaron ser CD25⁺CD127^{-/low}. Sin embargo, no todas fueron FOXP3⁺ y de hecho su expresión varió substancialmente con el pretratamiento con dexametasona. Estos resultados ponen de manifiesto que, si bien en linfocitos de sangre periférica existe una correlación inversa entre la expresión de CD127 y FOXP3, en linfocitos cultivados y activados a través del complejo CD3/TCR la expresión de

CD127 desciende independientemente de la expresión de FOXP3. Por lo tanto, CD127 no parece ser un buen marcador de células FOXP3⁺.

El TGFβ es una citocina supresora involucrada en la inducción de tolerancia. Diversos trabajos han demostrado, además, que esta citocina es un inductor natural de la expresión de FOXP3 (68-72). De hecho, la estimulación de linfocitos CD4⁺CD25⁻ en presencia de TGFβ genera células FOXP3⁺ con actividad reguladora, tanto en ratones (68-71) como en humanos (71, 72). En este estudio se ha confirmado el efecto del TGFβ sobre la expresión de FOXP3 a nivel de proteína y de mRNA en linfocitos CD4⁺CD25⁻ humanos activados con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2. Además, se demuestra que el efecto de la dexametasona aumentando la expresión de FOXP3 en linfocitos CD4⁺CD25⁻ ocurre también en las células generadas con TGFβ. De nuevo, la dexametasona fue capaz de incrementar los niveles génicos y proteicos de FOXP3. De hecho, a nivel de mRNA, la expresión de FOXP3 alcanzada por estas células fue incluso superior a la de los linfocitos CD4⁺CD25^{high} aislados de sangre periférica.

La funcionalidad de las células generadas in vitro bajo las distintas condiciones de cultivo se estudió analizando su capacidad para suprimir la proliferación de células efectoras autólogas estimuladas con PHA. Los resultados obtenidos demuestran que las células activadas y expandidas en presencia de IL-2 no poseen actividad reguladora. Estos resultados confirman los encontrados por unos autores (75, 76, 87-89) pero difieren de lo publicado por otros (62-66, 77). Las diferencias encontradas podrían deberse, al menos en parte, al estímulo utilizado o al momento en el que se analiza la actividad reguladora, ya que parece claro que la expresión de FOXP3 y la actividad reguladora en estas células, si la hubiera, es transitoria (77).

Los resultados mostrados en este capítulo aportan otras evidencias de que la expresión de FOXP3 en linfocitos humanos no es condición

suficiente para la adquisición de actividad supresora. Las células pretratadas con dexametasona, a pesar de mostrar una elevada expresión de FOXP3, no fueron capaces de suprimir de forma significativa la proliferación celular. Este resultado pone de manifiesto que, dado que es posible que existan determinados agentes capaces de aumentar FOXP3 sin conferir actividad reguladora, la expresión de este factor de transcripción no debe tomarse como garantía de capacidad supresora.

Por otro lado, y como ya ha sido demostrado por otros autores (68-70, 72), los resultados derivados de este estudio confirman el efecto del TGF β sobre la adquisición de actividad supresora en las células activadas a través del complejo TCR/CD3. De hecho, únicamente estos linfocitos fueron capaces de inhibir la proliferación de células mononucleares autólogas. En estas células la dexametasona aumentó la expresión de FOXP3, pero no la actividad supresora. No obstante, tanto en las células cultivadas en presencia de TGF β como en las cultivadas en ausencia del mismo se observó que las células pretratadas con dexametasona poseían una capacidad de inhibición ligeramente mayor que las no tratadas. Sin embargo, no se encontró correlación estadísticamente significativa entre el aumento en la expresión de FOXP3 y el de la actividad supresora.

De especial relevancia resulta el hecho de que las células pretratadas con dexametasona (*CD25⁺-Dex*) y las cultivadas con TGF β (*TGF β -Treg*) mostraron un porcentaje de células FOXP3⁺ y una MFI similar y, sin embargo, solamente las *TGF β -Treg* fueron capaces de inhibir la proliferación. Muy probablemente el TGF β , además de sus efectos sobre la expresión de FOXP3, pueda ser capaz de producir otras señales o generar otros mediadores, aún desconocidos, capaces de dar lugar a actividad reguladora.

Finalmente, los estudios de funcionalidad de las células reguladoras realizados con pacientes de lupus apoyan los resultados encontrados *in vitro*. Los corticoides han demostrado ser capaces de aumentar la expresión de FOXP3 y el porcentaje de células CD25^{high} en pacientes de LES (123, 124). Sin embargo, el estudio de la funcionalidad de estas células llevado a cabo en este trabajo demuestra que el efecto de los corticoides aumentando la expresión de FOXP3 y el número de linfocitos CD25^{high} no se relaciona con un aumento en la capacidad supresora de estas células.

De forma general, los resultados obtenidos muestran que en humanos la expresión de FOXP3 no es suficiente para la adquisición de capacidad reguladora. En el presente capítulo se ha demostrado que la dexametasona es capaz de incrementar la expresión de FOXP3 pero no la actividad reguladora. Es posible que esto ocurra, también, con otros agentes terapéuticos. Por otro lado, la simple activación vía TCR ocasiona la expresión de FOXP3, pero no parece conferir actividad reguladora, aunque los resultados obtenidos por diferentes autores varían en este sentido. La presencia de otros factores o mediadores aún desconocidos para la generación de células reguladoras parece ser necesaria, tal y como lo demuestra el hecho de que el TGF β sea capaz de aumentar la expresión de FOXP3 y, además, conferir actividad reguladora.

CAPÍTULO 4

**BALANCE TH17/TH1 EN EL LES. EFECTO DE LOS
GLUCOCORTICOIDES.**

4.1 INTRODUCCIÓN

Los glucocorticoides se utilizan en el tratamiento del LES desde hace décadas debido a sus efectos anti-inflamatorios. Sin embargo, ocurre con frecuencia que las pautas de tratamiento utilizadas habitualmente para tratar otras enfermedades autoinmunes no son capaces de controlar el curso de la enfermedad en el LES. La razón por la cual muchos de estos pacientes requieren dosis mayores de corticoides o necesitan combinarlos con otros agentes inmunosupresores no es aún conocida.

Los glucocorticoides (GC) actúan uniéndose al receptor de glucocorticoides (GC-R), que se encuentra en el citoplasma de muchos tipos celulares. El complejo GC/GC-R migra al núcleo, donde se une a determinadas secuencias del DNA denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs, glucocorticoid responding elements), presentes en los promotores de muchos genes –relacionados o no con el sistema inmune– y de esta forma modulan su transcripción. El complejo GC/CG-R puede interactuar con otros factores de transcripción e interferir con sus acciones. De hecho, la inhibición del factor de transcripción NF-kB es uno de los principales mecanismos mediante el cual los GC ejercen sus efectos anti-inflamatorios (161). En los últimos años se han descubierto numerosas interacciones de los GC con otros factores de transcripción, especialmente con los STATs, los cuales juegan un papel central en la señalización intracelular de las citocinas (162).

La unión de determinadas citocinas a su receptor de membrana en los linfocitos CD4⁺ vírgenes ocasiona la activación de STATs específicos, que migran al núcleo y se unen a secuencias diana en los promotores de determinados genes. Por esta razón los STATs juegan un papel preeminente en la diferenciación hacia un linaje Th determinado. La fosforilación de STAT4, involucrado en la señalización de la IL-12, es necesaria para la generación de células Th1 (163), mientras que STAT3

es el transductor de señal para muchas de las citocinas involucradas en la generación de células Th17, como IL-6 (10, 12), IL-23 (12, 164) e IL-21 (11).

Varios trabajos han demostrado que la IL-17 está incrementada en el LES (139, 165-168) sugiriendo que esta citocina podría estar involucrada en la patogénesis de esta enfermedad. Se han planteado diversas hipótesis para tratar de explicar este aumento pero, desafortunadamente, hasta la fecha ninguna de ellas ha sido satisfactoria.

En este capítulo se estudiarán las poblaciones Th17 y Th1 en el LES, su relación con las características clínicas e inmunológicas de los pacientes y la influencia que los tratamientos puedan ejercer sobre ellas.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Efecto de los corticoides sobre las células Th17 y Th1 en pacientes de lupus

Para cuantificar la cantidad de células efectoras se analizó mediante citometría de flujo la producción *in vitro* de IFN γ e IL-17 en células CD4⁺ de 75 pacientes de LES (Tabla 4.1) y 19 controles sanos, tras 5 h de estimulación con PMA y ionomicina en presencia de monensín. Los resultados mostraron que la mayoría de las células productoras de IFN γ e IL-17 se encontraban dentro de la subpoblación de memoria, ya que expresaban el marcador CD45RO (Fig 4.1), por lo que se denominaron Th17 a las células IL-17⁺IFN γ -CD4⁺CD45RO⁺ y Th1 a las IL-17⁻IFN γ ⁺CD4⁺CD45RO⁺.

Inicialmente se observó que los valores de MFI de IL-17 eran significativamente mayores en los pacientes de LES que en los controles, mientras que la MFI de IFN γ era ligeramente menor (Fig. 4.2a). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de células Th17 o Th1 entre pacientes y controles (Fig. 4.2b). Sin embargo, la proporción de células Th17 respecto a Th1 (ratio

Th17/Th1) se encontraba significativamente elevada en los pacientes de LES (Fig. 4.2b).

Tabla 4.1. Características de los pacientes de LES.

	<i>Sin tto.</i>	<i>Sin GC</i>	<i>Con GC</i>
Pacientes de LES (n)	12	32	31
Mujeres/hombres	12/0	30/2	30/1
Edad al diagnóstico, años	34.25±14.21	37.41±15.14	33.52±13.01
Duración enfermedad, años	8.36±4.27	13.99±9.22	11.71±9.23
Manifestaciones clínicas, n (%)			
Eritema malar	5 (41.7)	17 (53.1)	19 (61.3)
Lesiones discoides	0 (0.0)	6 (18.8)	4 (12.9)
Fotosensibilidad	7 (58.3)	22 (68.8)	16 (51.6)
Úlceras orales	6 (50.0)	14 (43.8)	14 (45.2)
Artritis	8 (66.7)	23 (71.9)	25 (80.6)
Serositis	3 (25.0)	4 (12.5)	6 (19.4)
Enfermedad renal	2 (16.7)	13 (40.6)	11 (35.5)
Enfermedad neurológica	1 (8.3)	2 (6.3)	5 (16.1)
Alteraciones hematológicas	5 (41.7)	23 (71.9)	23 (74.2)
Presencia de anti-dsDNA	7 (58.3)	24 (75.0)	24 (77.4)
anti-dsDNA, U/ml	24.37±30.79	22.01±36.07	39.29±85.32
Presencia de anti-ENA	3 (25)	20 (62.5)	13 (41.9)
anti-SSA+	3 (25.0)	16 (50.0)	10 (32.3)
anti-SSB+	1 (8.3)	8 (25.0)	5 (16.1)
anti-RNP+	0 (0.0)	6 (18.8)	6 (19.4)
anti-Sm+	0 (0.0)	2 (6.3)	7 (22.6)
Otros tratamientos, n (%)			
Antipalúdicos	-	32 (100)	22 (71.0)
Inmunosupresores ^a	-	3 (9.4)	12 (38.7)

^aAzatriopina, ciclosporina A, micofenolato mofetil o ciclofosfamida; Edad al diagnóstico, duración de la enfermedad y niveles de anti-dsDNA expresados como media ±SD; SD: desviación estándar.

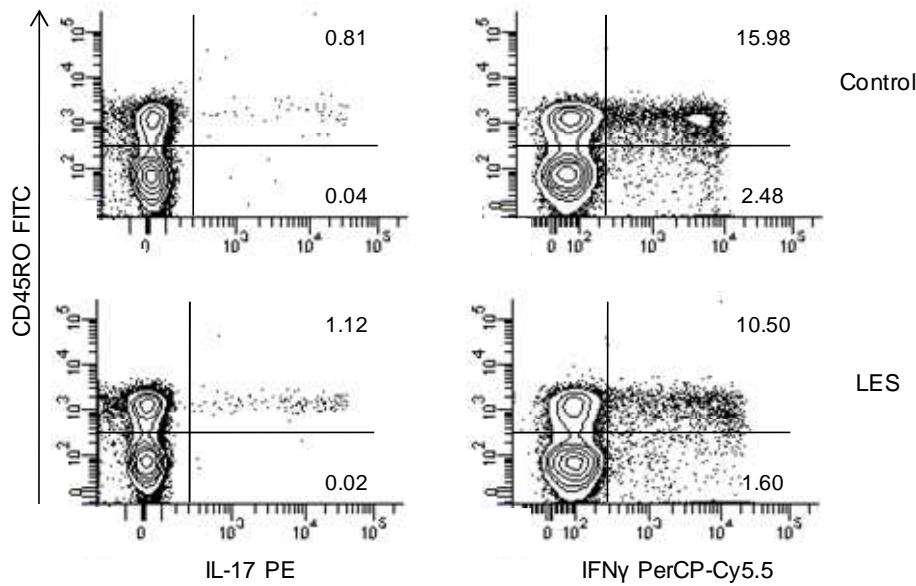


Figura 4.1 Expresión de IL-17 e IFN γ frente a CD45RO en un individuo sano y un paciente de LES.

Las alteraciones del balance Th17/Th1 podrían estar sólo presentes en pacientes con determinadas características clínicas o un tratamiento específico. No se encontró relación con la clínica, sin embargo, únicamente los pacientes de LES que se encontraban bajo tratamiento con glucocorticoides (dosis media (SD): 7.56 (4.74) mg prednisona/día) mostraban una desregulación significativa en el balance Th17/Th1, mientras que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre controles, pacientes sin tratamiento y aquellos tratados con otros medicamentos. Como se muestra en la figura 4.3a y b, en los pacientes tratados con corticoides la frecuencia de células Th17 y los valores de MFI de IL-17 fueron mayores, mientras que el porcentaje de la subpoblación Th1 y los niveles de expresión de IFN γ fueron menores, lo que sugiere que los glucocorticoides son capaces de actuar sobre las dos subpoblaciones celulares.

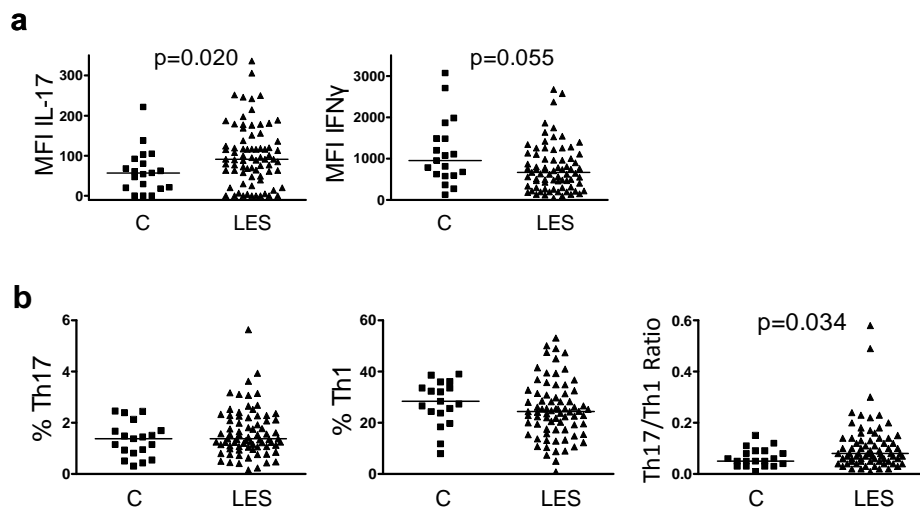


Figura 4.2 Valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) de IL-17 e IFN γ (a) y porcentajes de células Th1 y Th17 y ratio Th17/Th1 (b) en controles sanos (C) y pacientes de LES.

Es interesante resaltar que la desviación hacia la respuesta Th17 parece estar relacionada con la dosis de corticoides, ya que los pacientes con una dosis diaria menor de 5 mg/día (n=9) no mostraron este efecto (Fig. 4.3a)

Por otro lado, no se halló relación entre el ratio Th17/Th1 y el índice SLEDAI o el título de anticuerpos anti-dsDNA en la cohorte total de pacientes, lo que parece indicar que este desbalance no está ligado a la actividad de la enfermedad. De hecho, eran los pacientes sin tratamiento los que presentaban un índice SLEDAI mayor, mientras que los pacientes que se trataban con glucocorticoides tenían un SLEDAI intermedio (Fig. 4.3c). Sin embargo, se encontró una correlación positiva significativa entre el SLEDAI y el índice Th17/Th1 en los pacientes bajo tratamiento con glucocorticoides (Fig. 4.3d) mientras que esta relación no estaba presente en los pacientes que no eran tratados con glucocorticoides.

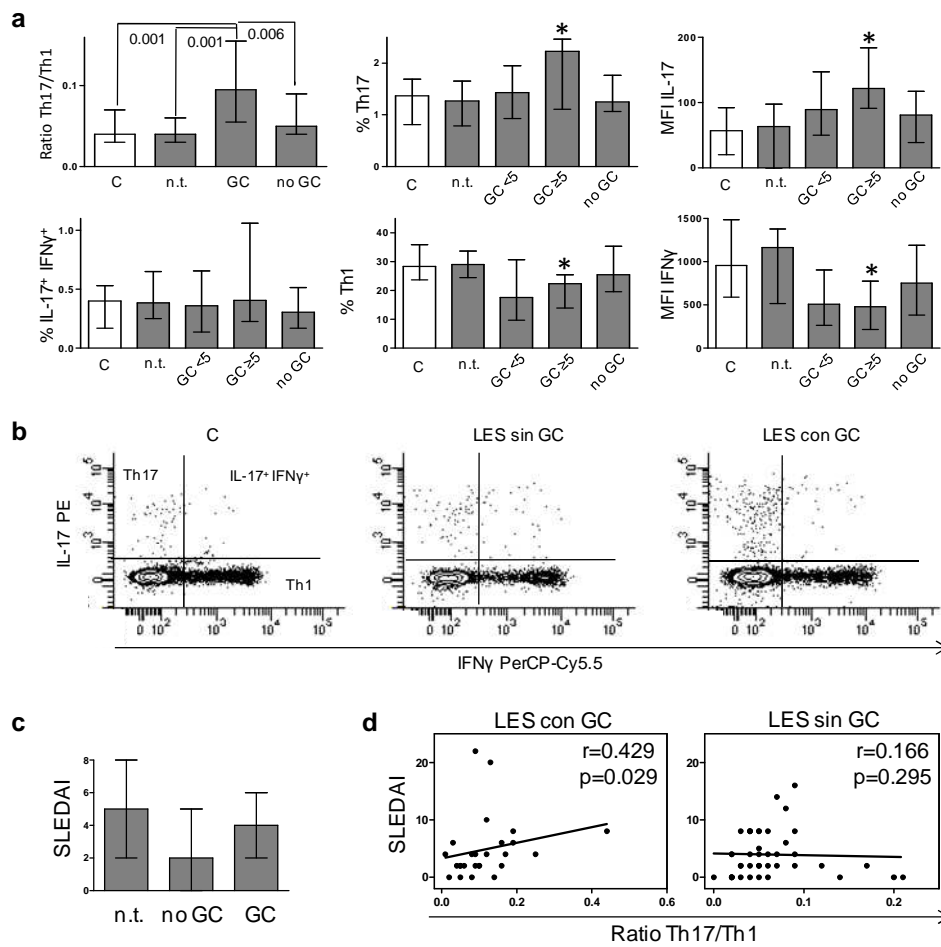


Figura 4.3. Efecto de los glucocorticoides y de la actividad de la enfermedad en las subpoblaciones Th17 y Th1. (a) Ratio Th17/Th1, porcentaje de células Th17, Th1, y células doble positivas (IL-17+IFN γ +CD45RO+) y valores de intensidad de fluorescencia en controles (C, n=19) y pacientes de LES clasificados según el tratamiento: no tratados (n.t., n=12), con dosis de glucocorticoides menores de 5 mg/día (GC<5, n=9), con dosis igual o superior a 5 mg/día (GC \geq 5, n=22) y bajo otros tratamientos (no GC, n=32). (b) Dot plots de un control sano, un pacientes de LES sin glucocorticoides y un paciente de LES bajo tratamiento con glucocorticoides. (c) SLEDAI de los pacientes de LES clasificados según el tratamiento. (d) Correlaciones entre el índice Th17/Th1 y el SLEDAI en pacientes con tratamiento corticoideo y en aquellos bajo otros regímenes. n.t.: pacientes no tratados; GC: glucocorticoides. Las barras representan mediana (IR).

4.2.2 Asociación entre la presencia de autoanticuerpos y la respuesta Th17.

El análisis de la relación entre las características clínicas o inmunológicas y la respuesta Th17 mostró que el ratio Th17/Th1 no se relacionaba con ningún parámetro clínico, pero se pudo comprobar que la presencia de autoanticuerpos estaba asociada con la tendencia a desarrollar una respuesta Th17 excesiva. De hecho, los pacientes con

anticuerpos anti-ENA (SSA, SSB, Sm o RNP) mostraban un porcentaje mayor de células Th17 que los pacientes sin ellos, mientras que no se encontraron diferencias entre los pacientes con y sin anticuerpos anti-DNA (Fig. 4.4a). Tanto los pacientes anti-ENA⁺ como los negativos tenían cantidades similares de células Th1, excepto aquellos con anticuerpos anti-Sm, que mostraron un porcentaje menor de esta población celular. (Fig. 4.4b).

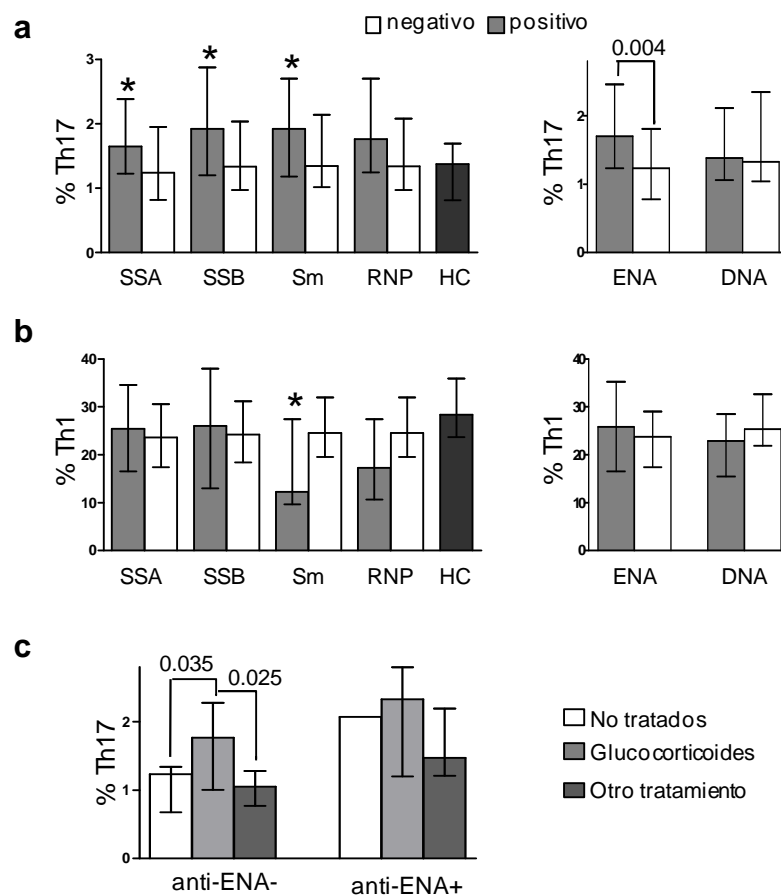


Figura 4.4 Incremento de la respuesta Th17 en pacientes anti-ENA⁺. Poblaciones Th17 (a) y Th1 (b) en los pacientes de LES clasificados según la presencia o ausencia de autoanticuerpos anti-ENA (SSA, SSB, Sm o RNP) o anti-dsDNA. (c) Influencia del tratamiento en pacientes anti-ENA⁺ y ENA⁻.

Dado que tanto los pacientes anti-ENA⁺ como aquellos que están tratados con corticoides poseen un mayor número de células productoras de IL-17, se analizó el efecto de ambas variables simultáneamente (Fig. 4.4c). Todos los pacientes tratados con

glucocorticoides tenían incrementado el porcentaje de células Th17, y las diferencias entre los anti-ENA⁺ y ENA⁻ no alcanzaron el nivel de significación estadística requerido [2.33 (1.60) vs 1.76 (1.24), $p = 0.258$]. Sin embargo, los pacientes anti-ENA⁺ que recibían otros tratamientos no mostraban un porcentaje de células Th17 significativamente mayor que los controles sanos [1.47 (0.98) vs 1.37 (0.88)].

4.2.3 Efecto de los glucocorticoides en la expresión de STAT3 e IL-6R en los pacientes de LES

Con el objetivo de tratar de comprender mejor el mecanismo por el cual los corticoides incrementan la producción de IL-17 se decidió cuantificar la expresión génica del receptor de la IL-6 (IL-6R) y STAT3 – moléculas involucradas en la respuesta Th17– e IL-12R y STAT4 – requeridas para la generación de células Th1–. El análisis se realizó en 8 sujetos sanos y 30 pacientes de LES (sin tratamiento: $n=6$; con glucocorticoides: $n=14$; con otro tratamiento: $n=10$) mediante RT-PCR a tiempo real. En la figura 4.5a se puede observar que los pacientes tratados con glucocorticoides [dosis media (SD): 10.16 (7.58) mg/día] tenían un niveles de expresión de STAT3 significativamente mayores que los controles sanos, mientras que no se hallaron diferencias entre controles, pacientes no tratados y aquellos que se encontraban bajo otros tratamientos. Resultados análogos se encontraron al analizar la expresión del receptor de la IL-6R (Fig. 4.5b) siendo, de nuevo, los pacientes bajo tratamiento con corticoides los que mostraron unos niveles de expresión de IL-6R mayores. El análisis de la expresión génica de STAT4 y del receptor de la IL-12 no reveló diferencias importantes entre los distintos grupos de individuos.

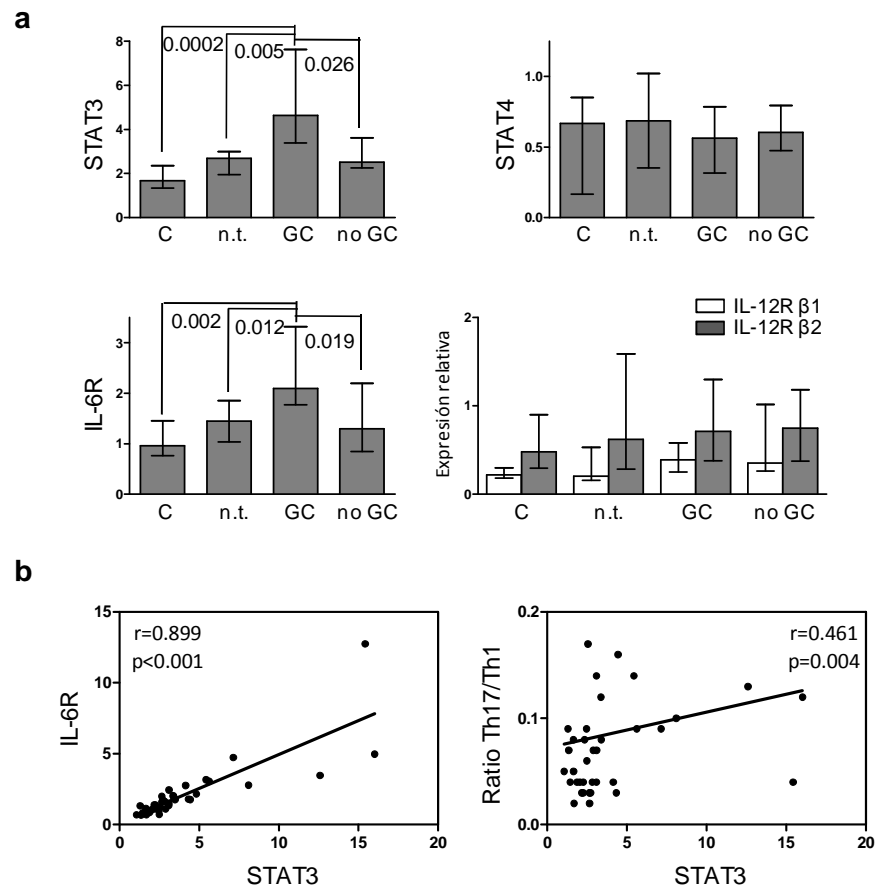


Figura 4.5 La expresión génica de STAT3 y de IL-6R está aumentada en el los pacientes de LES que toman glucocorticoides. (a) La expresión génica relativa de STAT3, STAT4, IL-6R, IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 se determinó mediante RT-PCR a tiempo real. La expresión de STAT3 e IL-6R está elevada en pacientes bajo tratamiento con glucocorticoides (CG, n=14), en comparación con controles sanos (C, n=8), pacientes sin tratar (n.t., n=6) y aquellos que siguen otros tratamientos (no GC, n=10). No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de STAT4, IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2. Las barras representan mediana (IR). (b) Correlaciones entre STAT3, IL-6R y el ratio Th17/Th1.

Como era esperable, la expresión de STAT3 se correlacionó muy fuertemente con la de IL-6R pero también con el ratio Th17/Th1 (Fig.4.5b). También se encontró una correlación positiva entre el ratio Th17/Th1 y la expresión de IL-6R ($r = 0.333$, $p = 0.041$), lo que avala la importancia de estas moléculas en la polarización hacia la respuesta Th17.

4.3 DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo demuestran la existencia de una relación entre el uso de glucocorticoides y las alteraciones encontradas en las poblaciones Th1 y Th17 en los pacientes de LES. Diversos trabajos han demostrado que los pacientes de LES tienen incrementado el número de células Th17 (165, 166, 168) y el alterado balance Th17/Th1 (169). Algunos de estos autores han relacionado este aumento con la actividad de la enfermedad (165, 168, 169). Sin embargo, los resultados de este capítulo muestran que el aumento de la población Th17 en el LES está asociado al uso de glucocorticoides. Este resultado no se contradice necesariamente con los publicados por otros autores, ya que la mayor parte de los pacientes activos incluidos en los anteriores trabajos se encontraban bajo tratamiento con corticoides. En este estudio, por el contrario, se analizaron un número de pacientes relativamente grande, que incluía pacientes tratados con corticoides y con otras terapias, así como pacientes no tratados con SLEDAI altos, lo que permite, al menos en parte, separar el uso de corticoides de la actividad de la enfermedad, dos variables que frecuentemente se encuentran ligadas.

Por otro lado, el porcentaje de células Th17 no se correlaciona con la actividad de la enfermedad (SLEDAI) o el título de anticuerpos anti-DNA pero, sin embargo, se encuentra elevado en pacientes con anticuerpos anti-ENA, resultado que apoya la idea del diferente origen de los autoanticuerpos en el LES. El desarrollo de anticuerpos frente a SSA y SSB, dos moléculas relacionadas con la apoptosis (170), se favorece en un medio pro-inflamatorio (112, 171), mientras que la presencia de anticuerpos anti-DNA se asocia con la respuesta humoral y altos niveles IL-10 (172, 173). La presencia de anticuerpos anti-ENA, según estos resultados, podría utilizarse como un biomarcador que indicaría la tendencia a desarrollar una respuesta Th17 excesiva o aberrante, dato que tendría que ser tomado especialmente en cuenta en

caso de que esos pacientes vayan a ser sometidos a tratamiento con corticoides. Sin embargo, será necesaria la realización de un estudio longitudinal prospectivo para confirmar este resultado.

El análisis de la expresión génica de STAT3 y STAT4 –transductores de señales relacionados con el desarrollo de las células Th17(174) y Th1 (7), respectivamente– y de los receptores de IL-6 e IL-12 permitió plantear una posible explicación para las alteraciones encontradas en el balance Th17/Th1 en los pacientes de lupus. La IL-6 es una citocina clave en la polarización de las células T CD4⁺ hacia células Th17 y que señala mediante STAT3 (10). De hecho, los resultados aquí presentados muestran una fuerte correlación entre la expresión de IL-6R y STAT3. Además, encontramos que los pacientes tratados con corticoides mostraban una elevación en la expresión génica de STAT3 e IL-6R, corroborando los datos encontrados al analizar la relación del desbalance Th17/Th1 y el uso de corticoides. El incremento en la expresión de STAT3, asociado con una alta tasa de transcripción de sus genes diana, ha sido previamente demostrado en el LES (175). De igual forma, se ha sugerido que los altos niveles séricos de IL-6 propios del lupus (176-178) podrían jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, las terapias de bloqueo del receptor de la IL-6, que han mostrado su eficacia en el tratamiento de la artritis reumatoide (179) y otras enfermedades autoinmunes (180), son capaces de mejorar los síntomas del lupus, especialmente la nefritis (181).

El hecho de que los corticoides aumenten la producción de IL-17 puede resultar sorprendente, pero no se contradice con el conocimiento actual sobre el sinergismo existente entre estos agentes terapéuticos y la producción de algunas citocinas, como la IL-6 y la IL-10 (182-184). Respecto a la IL-6 se han descrito diferentes niveles de interacción con los glucocorticoides. Por una parte, los glucocorticoides son capaces de inducir directamente la expresión de IL-6R (182-184), pero también se

ha descrito una interacción física entre el complejo GC/GC-R y STAT3 inducido por IL-6 (185). La formación del complejo STAT3/GC/GC-R podría explicar la razón por la que los genes diana de STAT3 pueden ser “superinducidos” en presencia de glucocorticoides, así como el hecho de que STAT3 sea un co-activador de la transcripción mediada por GRE. Este tipo de sinergismo se ha demostrado para la IL-10 (186). Los glucocorticoides son capaces de aumentar la expresión de IL-10 tanto in vivo como in vitro (182, 183, 187) y ha sido demostrado que son capaces de inducir la unión de STAT3 al motivo de respuesta a STAT presente en el promotor de la IL-10 (186). Es interesante tener en cuenta que la mayor parte de las citocinas relacionadas con el desarrollo de las células Th17 señalizan mediante STAT3, por lo que es posible que los corticoides sean capaces de establecer un sinergismo similar con todas ellas. Por lo tanto, la capacidad de los glucocorticoides para incrementar la producción de IL-17 podría ser el resultado de una superinducción de la expresión del gen de la IL-17 mediada por STAT3, cuyo aumento se debería al incremento de la señalización mediante el receptor de la IL-6. En este proceso, por tanto, no sería necesaria la presencia de GREs en el promotor del gen de la IL-17, si bien es cierto que otros mecanismos, directos o indirectos, podrían estar involucrados en el efectos de los corticoides sobre el balance Th17/Th1.

CAPÍTULO 5

ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES FOXP3⁺ EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

5.1 INTRODUCCIÓN

La existencia de alteraciones fenotípicas o funcionales en las células T CD4⁺, tanto reguladoras como efectoras, ha sido reiteradamente descrita en el LES. Estas alteraciones pueden ser muy variadas, e incluyen transducción de señales intracelulares defectuosa, desbalance en la producción de citocinas y trastornos en la apoptosis.

Las células reguladoras CD25^{high}FOXP3⁺ juegan un papel muy importante en el control de la respuesta inmune. En personas sanas constituyen aproximadamente el 1-2% del total de linfocitos CD4⁺ y se caracterizan por su capacidad para inhibir la proliferación celular y controlar la producción de citocinas pro-inflamatorias –TNF α e IFN γ entre otras–. El control que las células Treg ejercen sobre la producción de citocinas influye en el medio en el que se producirá la activación de los linfocitos T CD4 vírgenes por lo que un adecuado funcionamiento de esta población celular es fundamental para mantener un balance adecuado entre los distintos tipos de células efectoras y reguladoras.

Un gran número de trabajos han evaluado el papel de las células Treg en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. La mayoría de ellos han encontrado que estos pacientes tienen menos células Treg que las personas sanas o que éstas son funcionalmente deficientes. A pesar de su relevancia en autoinmunidad, los estudios en los que se analizaron el número y/o funcionalidad de las células Treg en el LES en los últimos años han dado lugar a resultados muy variados, por lo que aún no existe un consenso claro acerca del papel que las células Treg juegan en la patogénesis del LES (149). La heterogeneidad en los resultados podría ser debida, al menos en parte, a los diferentes métodos utilizados para cuantificar y purificar las células Treg o determinar su actividad funcional.

Aunque FOXP3 es el marcador más utilizado para identificar y cuantificar las células reguladoras CD4⁺CD25^{high} procedentes del timo

(nTreg) (29) este factor de transcripción se expresa también en células reguladoras generadas en periferia, e incluso en células T activadas sin actividad supresora (76, 188). Además, en los últimos años se ha descrito una subpoblación de células FOXP3⁺ sin expresión de CD25, cuya función y origen aún se desconocen, que se ha encontrado aumentada en los pacientes de LES (189-192).

Las células Treg se caracterizan por su capacidad para suprimir las funciones de las células T efectoras, tales como la proliferación y la producción de citocinas. Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que las células Treg son capaces de asumir funciones efectoras propias de otras células cuando son sometidas a ambientes pro-inflamatorios (102, 193, 194). El descubrimiento de los fenómenos de plasticidad, a los que son especialmente propensas las células Treg, ha complicado el ya de por sí difícil análisis fenotípico y funcional de esta población. Concretamente, las células Treg muestran una elevada tendencia a transdiferenciarse en células Th17. El desarrollo de las células Treg y Th17 es dependiente del medio de citocinas, siendo IL-1 β e IL-6 las citocinas claves en la generación de células productoras de IL-17 -. Esta citocina, a su vez, actúa sobre una gran variedad de tipos celulares induciéndolos a producir mediadores de la inflamación como la IL-8 (17) y el GM-CSF (195). Por otro lado, el TGF β 1 es fundamental en la inducción y el mantenimiento de las células Treg y parece estar involucrado en sus funciones antiproliferativas (196).

En este capítulo se estudian fenotípicamente las diferentes subpoblaciones de células FOXP3⁺ presentes en los pacientes de LES y se evalúa su relación con las células Th y con los niveles séricos de citocinas.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Expresión de FOXP3 en el LES

Se determinó la frecuencia de las células FOXP3⁺ con diferentes niveles de expresión de CD25 en células CD4⁺ provenientes de 29 controles sanos y 75 pacientes de LES, 8 de los cuales habían sido diagnosticados en el último año (pacientes de diagnóstico reciente) (Fig. 5.1). Los datos clínicos y demográficos de los pacientes se muestran en la tabla 5.1. El índice SLEDAI, el título de anti-dsDNA y los niveles séricos de IFN α se determinaron como indicadores de actividad de la enfermedad. La tabla 5.2 resume las diferencias encontradas entre pacientes y controles sanos. En primer lugar se observó que la cantidad total de células FOXP3⁺ y FOXP3⁺CD127^{-/low} era significativamente mayor en los pacientes que en los controles. Sin embargo, los porcentajes de células CD25^{high}FOXP3⁺ y CD25^{high}CD127^{-/low}, consideradas las células Treg clásicas, fueron similares entre los dos grupos de sujetos, lo que indica que el aumento encontrado en el porcentaje de células FOXP3⁺ se debía a las subpoblaciones CD25⁻ y CD25^{low}. Efectivamente, la proporción de linfocitos CD25⁻ y CD25^{low} que expresaban FOXP3 estaban claramente elevada en el LES (Tabla 5.2). También se observó un aumento significativo en el porcentaje de células CD25^{low} en los pacientes de LES, con la consiguiente disminución de los linfocitos CD25⁻. Además, la cantidad de células CD127^{-/low} que expresan niveles intermedios (low) de CD25 fue también significativamente mayor en los pacientes que en los controles. Todos estos datos sugieren un incremento en las células T CD4⁺ de los pacientes de LES.

Seguidamente se decidió analizar la posible relación de las diferentes subpoblaciones de células FOXP3⁺ CD4⁺ con el tratamiento o la actividad de la enfermedad. No se pudo confirmar ninguna asociación, pero, sin embargo, el número de células CD25⁻ y CD25^{low} FOXP3⁺ se correlacionaron inversamente con la cantidad de linfocitos CD4⁺ (Fig 5.2a). También se encontró que el descenso en el número de CD4⁺

estaba relacionado con el incremento en la población de células CD25⁻CD45RO⁺ (Fig 5.2a), lo que parece sugerir que en el lupus se produce una reducción selectiva de la población FOXP3⁻CD45RO⁻CD25^{-/low}CD4⁺.

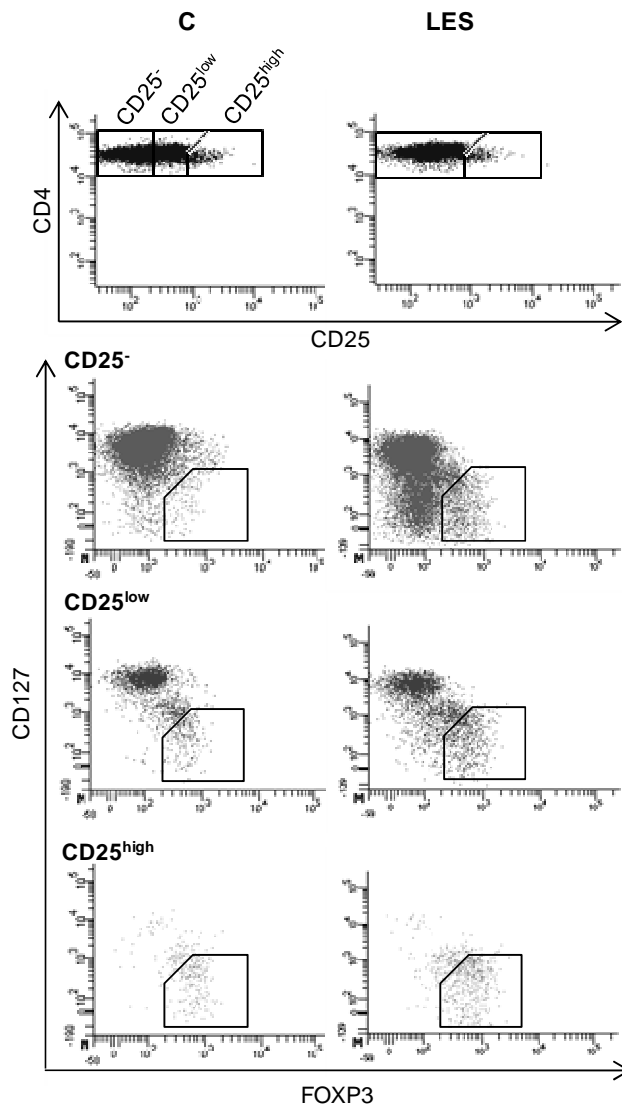


Figura 5.1 Expresión de FOXP3 y CD127 en las subpoblaciones CD25⁻, CD25^{low} y CD25^{high}. Se muestran los dot plots de un donante sano (C) y de un paciente de lupus.

Tabla 5.1 Características de los pacientes de LES

<i>Pacientes de LES, n</i>	75
Mujeres/hombres	72/3
Edad al diagnósticos (media±SD), años	35.36 ±14.30
Duración de la enfermedad (media±SD), años	12.40 ±8.91
<i>Manifestaciones clínicas, n (%)</i>	
Eritema malar	40 (53.3)
Lesiones discoides	10 (13.3)
Fotosensibilidad	45 (60.0)
Úlceras orales	34 (45.3)
Artritis	56 (74.7)
Serositis	13 (17.3)
Enfermedad renal	26 (34.7)
Enfermedad neurológica	7 (9.3)
Enfermedad hematológica	51 (68.0)
Presencia de anti-dsDNA	55 (73.3)
Título anti-dsDNA (media±SD), U/ml	28.9 ±58.9
Presencia de anti-ENA	36 (48.0)
Presencia de anti-SSA	29 (38.6)
Presencia de anti-SSB	14 (18.6)
Presencia de anti-Sm	9 (12)
Presencia de anti-RNP	13 (17.3)
<i>Tratamiento, n (%)</i>	
No tratados o AINEs	12 (16.0)
Antipalúdicos	54 (72.0)
Glucocorticoides	31 (41.3)
Dosis (media±SD), mg/día	7.56 ±4.74
Inmunosupresores ^a	15 (20.0)

^aAzaptoprina, ciclosporina A, micofenolato o ciclofosfamida.

SD: desviación estándar.

AINEs: anti-inflamatorios no esteroideos.

Tabla 5.2 Subpoblaciones CD4⁺ en controles sanos y pacientes de LES

% sobre CD4	Controles	LES	valor p
FOXP3 ⁺	6.41 (4.23)	10.22 (6.89)	0.001
FOXP3 ⁺ CD127 ^{-/low}	5.67 (3.23)	8.59 (6.77)	0.001
CD25 ^{high}	2.60 (2.99)	2.95(3.07)	0.191
CD25 ^{high} FOXP3 ⁺	1.47 (0.92)	1.65 (1.91)	0.333
CD25 ^{high} CD127 ^{-/low}	1.94 (1.35)	2.10 (2.43)	0.303
CD25 ^{high} CD45RO ⁺	1.62 (1.44)	0.90 (0.89)	0.039
CD25 ^{low}	13.69 (11.64)	19.06 (9.10)	0.002
CD25 ^{low} FOXP3 ⁺	2.19 (1.69)	3.42 (1.86)	0.0003
CD25 ^{low} CD127 ^{-/low}	5.18 (2.11)	6.14 (3.52)	0.019
CD25 ^{low} CD45RO ⁺	9.62 (7.61)	8.10 (6.77)	0.239
CD25 ⁻	83.39 (14.61)	77.72 (10.56)	0.003
CD25 ⁻ FOXP3 ⁺	3.13 (2.18)	6.71 (7.25)	0.00001
CD25 ⁻ CD127 ^{-/low}	23.86 (13.55)	25.62 (21.00)	0.876
CD25 ⁻ CD45RO ⁺	28.85 (15.37)	35.90 (18.10)	0.121

Los valores se representan como mediana (IR).

Como era de esperar, el número de linfocitos T CD4⁺ estaba disminuido en nuestra cohorte de pacientes ($40.74 \pm 9.46\%$ vs $33.45 \pm 10.97\%$; $p=0.002$), aunque esta reducción sólo estaba presente en el grupo de pacientes con enfermedad establecida (media (SD): 32.97 (11.26) %) y no en los pacientes de reciente diagnóstico –menos de 1 año– (37.44 (7.64) %).

Puesto que el número de células CD25⁻ estaba significativamente reducido en los pacientes de LES (Tabla 5.2), se analizó el porcentaje de células FOXP3⁺ dentro de cada una de las subpoblaciones –CD25⁻, CD25^{low} y CD25^{high} – en los pacientes de LES clasificados según la duración de la enfermedad. La figura 5.2b muestra que los pacientes

con más de 1 año de evolución de la enfermedad tienen un mayor número de células FOXP3⁺ en la subpoblación CD25⁻. Sin embargo, dentro de la subpoblación CD25^{low} la mayor cantidad de células FOXP3⁺ se encontró en el grupo de pacientes recientemente diagnosticados – grupo que presentó, además, los valores más altos de SLEDAI, de título de anti-dsDNA y niveles séricos de IFN- α (Fig. 5.2c)–. Estos datos apoyan la hipótesis de que las células CD25^{low}FOXP3⁺ incluyen mayoritariamente linfocitos activados.

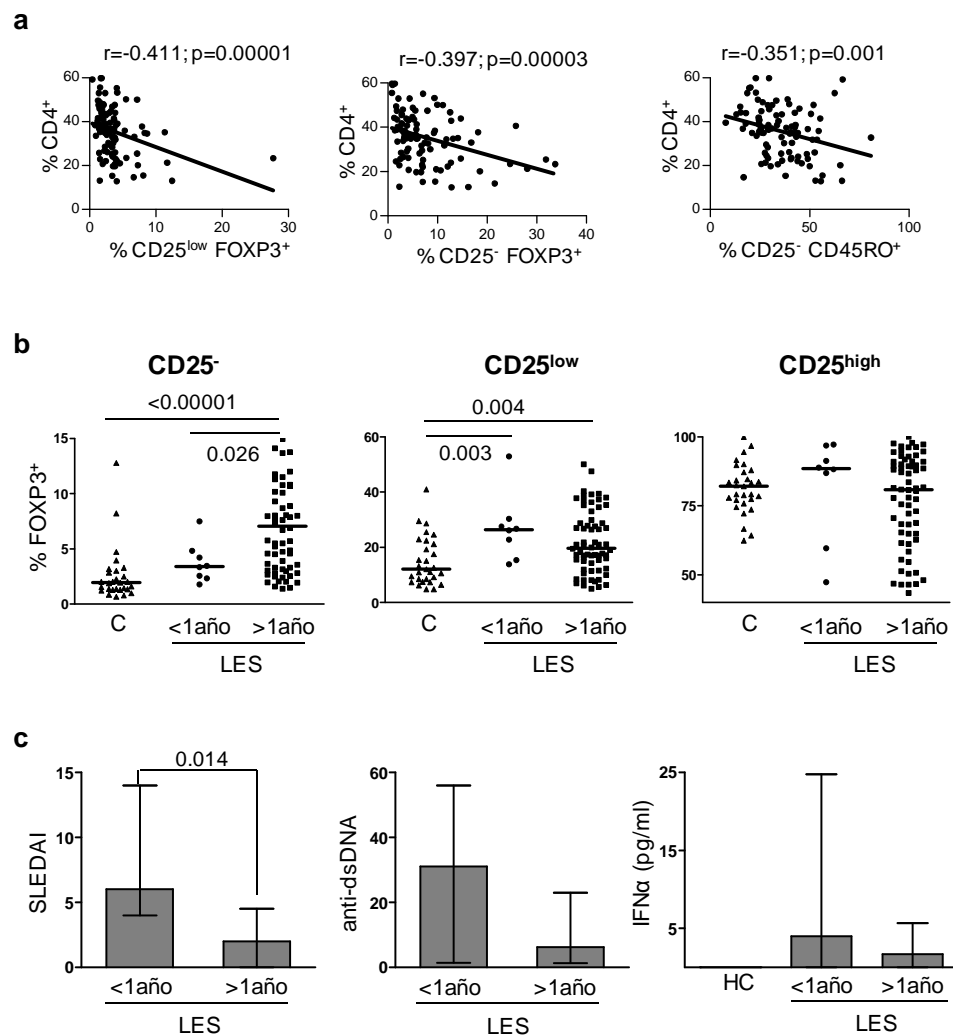


Figura 5.2 (a) Correlaciones entre la frecuencia de células T CD4⁺ y los porcentajes de CD25-FOXP3⁺, CD25^{low}FOXP3⁺ y CD25-CD45RO⁺. (b) Proporción de células FOXP3⁺ dentro de las subpoblaciones CD25⁻, CD25^{low} y CD25^{high}, en controles sanos y pacientes de LES clasificados según la duración de la enfermedad. (c) SLEDAI, título de anti-DNA y concentración sérica de IFN α en pacientes de diagnóstico reciente en comparación con los pacientes con mayor tiempo de evolución. Las barras representan mediana (IR).

Las diferencias encontradas en la población CD25⁻FOXP3⁺ entre los pacientes de diagnóstico reciente y los de mayor tiempo de evolución no parecen estar relacionadas con el tratamiento o la actividad de la enfermedad. De hecho, sólo 2 pacientes de diagnóstico reciente recibían altas dosis de glucocorticoides (20 mg/día) y presentaban enfermedad activa (SLEDAI: 22 y 6; título anti-dsDNA: 400 y 56 U/ml), pero los porcentajes de células FOXP3⁺ dentro de la subpoblación CD25⁻ de estos pacientes fueron bajos (3.35% y 4.22%). Los otros pacientes incluidos en el grupo de diagnóstico reciente estaba sin tratamiento (n=5) o bajo tratamiento con antipalúdicos (n=1).

5.2.2 Células Th productoras de citocinas en el LES y su relación con FOXP3

Se cuantificaron las células Th productoras de citocinas en controles y pacientes de lupus y su posible relación con las distintas subpoblaciones de células FOXP3⁺ como una medida de su función supresora in vivo. Para ello se analizó mediante citometría flujo la producción de IL-10, TNF α , IL-17 e IFN γ en células T CD4⁺CD45RO⁺ tras de 5 horas de estimulación con PMA y ionomicina, en presencia de monensín (Fig. 5.3). Simultáneamente se analizó la expresión de FOXP3 y CD25.

La figura 5.4 muestra que, en los controles sanos, el porcentaje de linfocitos productores de IFN γ , TNF α o IL-10 se correlaciona negativamente con la frecuencia de células CD25^{high}FOXP3⁺, de acuerdo con la idea de que esta población de células Treg convencional es capaz de controlar las funciones efectoras de los linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, no se encontraron estas correlaciones en los pacientes de LES, lo que sugiere una alteración en la capacidad de las células Treg para suprimir las células efectoras Th en el LES.

Por otro lado, no se halló evidencia de que las células CD25⁻ o CD25^{low} FOXP3⁺ estén involucradas en la regulación de la producción de

citocinas, ya que no se correlacionaron con los porcentajes de células productoras en pacientes ni en los individuos sanos.

Es interesante resaltar que ni las células CD25^{high}FOXP3⁺ procedentes de controles ni las de los pacientes se correlacionaron con el número de células productoras de IL-17 (Fig. 5.4). Sin embargo, se encontró que la frecuencia de células CD25^{high} que producían IL-17 estaba ligeramente

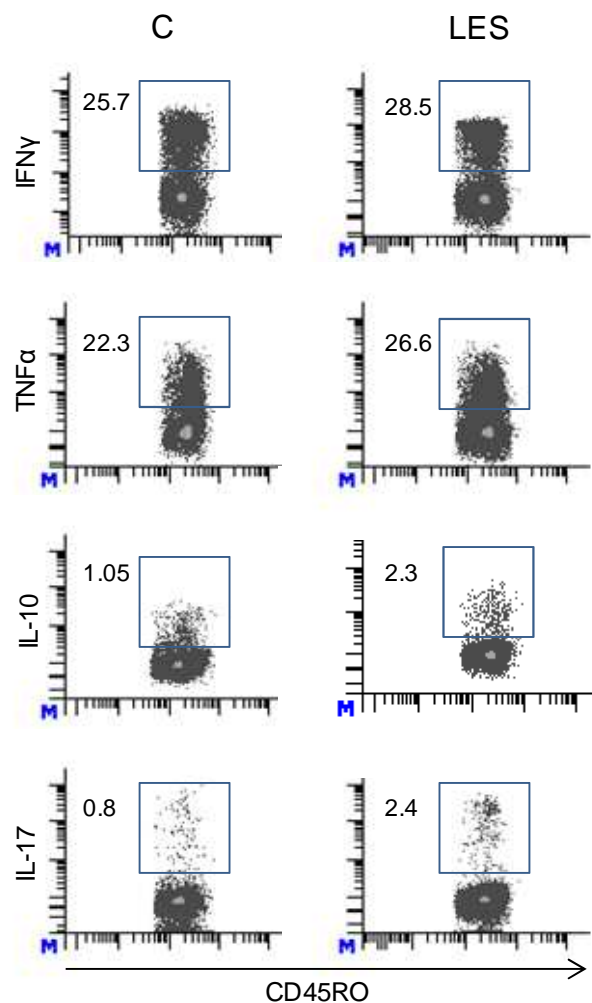


Figura 5.3 Células Th productoras de citocinas. Las células se estimularon con PMA y ionomicina durante 5 h en presencia de monesín. Después se tiñeron extracelular e intracelularmente para la detección de las citocinas mediante citometría de flujo. Se muestran dot plots representativos de un donante sano y un paciente de LES

elevada en los pacientes con enfermedad activa (HC: 0.95 (1.12); SLEDAI \leq 8: 1.02 (1.16); SLEDAI $>$ 8: 1.65 (1.05)). Este dato parece indicar que las células CD25^{high} de los pacientes tienen cierta tendencia a secretar IL-17 más que suprimir su producción. De hecho, el ratio IL-17⁺/FOXP3⁺ dentro de la subpoblación de células CD25^{high} estaba significativamente elevado en los pacientes de LES activos, indicando la existencia de una desviación en la función de las células CD25^{high}, en principio supresoras, de los pacientes de LES. Igualmente, los ratios IL-17⁺/IFN γ ⁺ e IL-17⁺/TNF α ⁺ en las células CD25^{high} estaban aumentado en los pacientes con enfermedad activa (Fig. 5.5), confirmando que las células CD25^{high} de los pacientes de LES difieren de las de los controles sanos.

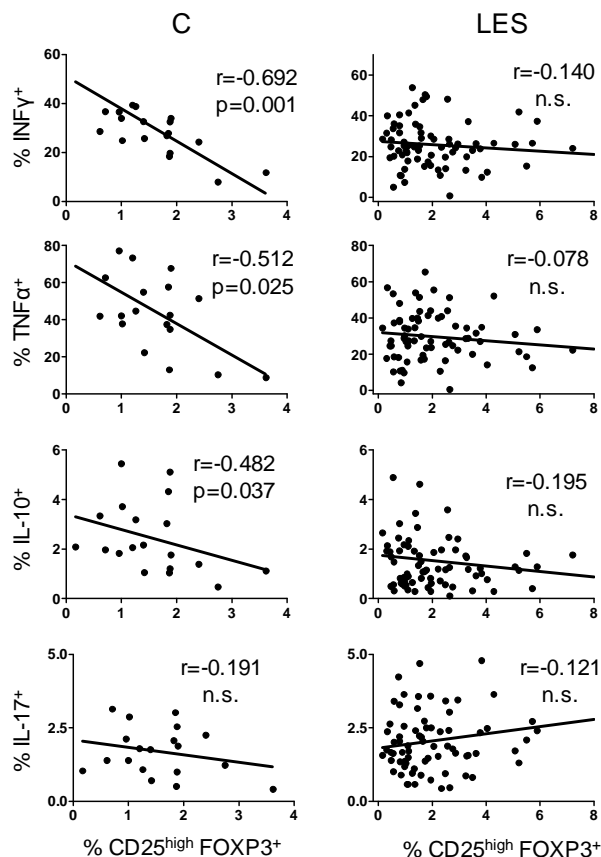


Figura 5.4 Correlaciones entre las células CD25^{high}FOXP3⁺ y las células productoras de citocinas en controles sanos (C) y pacientes de LES.

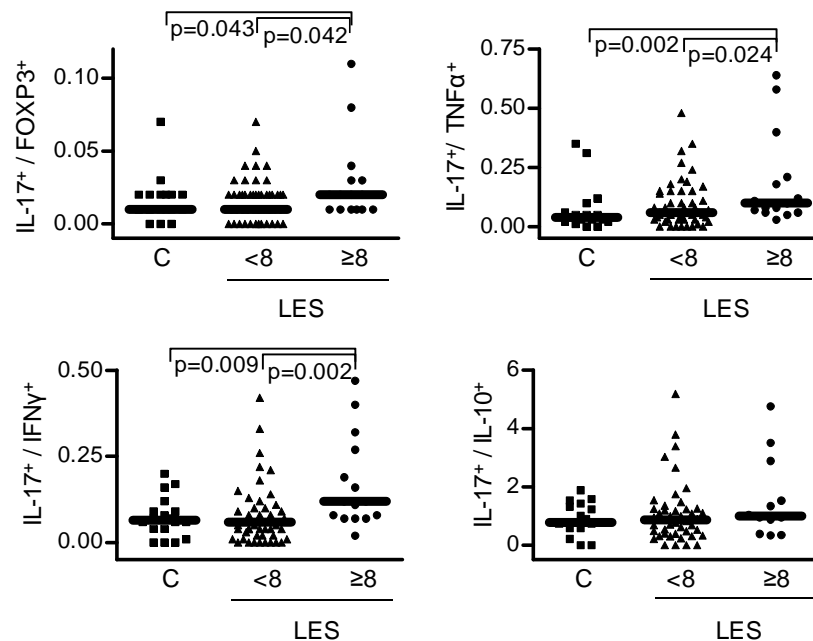


Figura 5.5 Ratios IL-17⁺/FOXP3⁺, IL-17⁺/TNFα⁺, IL-17⁺/IFNγ⁺ e IL-17⁺/IL-10⁺ en las células CD25^{high} de controles (C) y pacientes de LES clasificados según la actividad de la enfermedad (SLEDAI≥8, n=16). En las gráficas se representa la mediana.

5.2.3 Relación entre los niveles séricos de citocinas y las células CD4⁺FOXP3⁺

Puesto que tanto las células FOXP3⁺ como las Th17 parecen estar involucradas en la patogenia del LES, se analizó la posible relación entre varias citocinas –relacionadas con la generación o la función efectora de las células Th17 o Treg– y las alteraciones encontradas en las células FOXP3⁺ de los pacientes de LES. Para ello se cuantificó la concentración de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, TGFβ y GM-CSF en el suero de los enfermos lúpicos y los controles sanos.

Los niveles séricos de IL-6 fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles (media ± SD: 0.68 ± 0.86 vs 2.74 ± 4.30 pg/ml, p=0.0002). La IL-8 y el GM-CSF también estaban elevados en los pacientes (IL-8: 13.3 ± 8.0 vs 42.0 ± 78.6 pg/ml, p=0.0001; GM-CSF: 2.31 ± 3.23 vs 4.3 ± 6.05 pg/ml, p=0.014), mientras que la concentración de TGFβ resultó estar significativamente disminuida en la cohorte de pacientes (19.1 ± 4.2 vs 13.8 ± 4.1 ng/ml, p ≤ 0.001). No se encontraron

diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de IL-1 β (101.2 ± 169.2 vs 257.5 ± 582.2 fg/ml) e IL-17 (5.2 ± 20.8 vs 7.8 ± 13.0 pg/ml).

Como era de esperar, la concentración de TGF β en el suero de los controles se correlacionó positivamente con la frecuencia de células CD25^{high}FOXP3⁺, asociación que no se encontró en los pacientes de LES (Fig. 5.6a). Por el contrario, el número de células CD25^{high}FOXP3⁺ de los pacientes de LES se correlacionó positivamente con los niveles de IL-17 e IL-8 y negativamente con la IL-6 (Fig. 5.6b). La asociación entre las células Treg y los niveles de séricos de IL-17, presente en pacientes, pero no en controles, apoya el resultado previo que muestra la tendencia de las células CD25^{high} de los pacientes de LES a secretar IL-17.

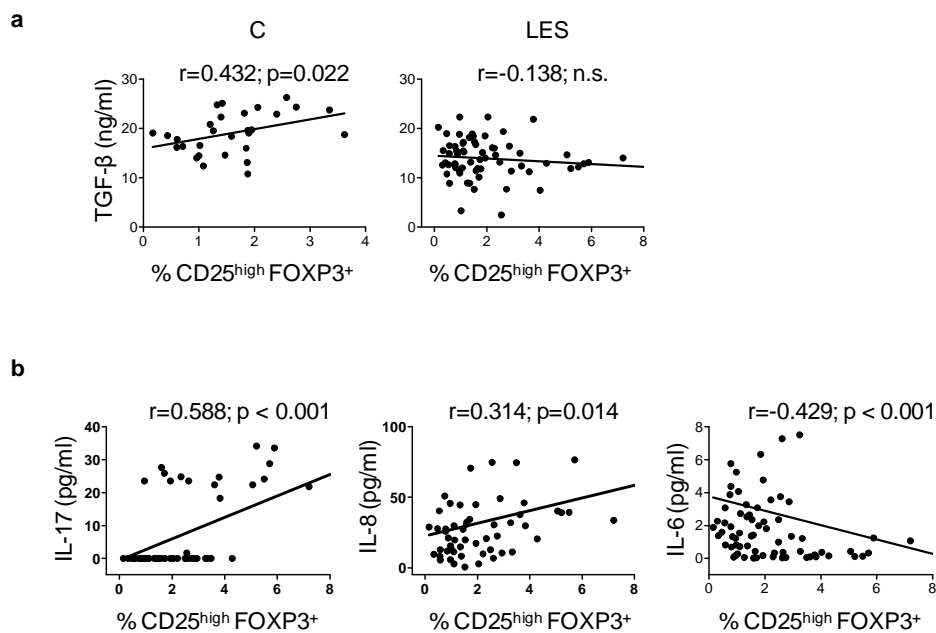


Figura 5.6 Asociación entre las células CD25^{high}FOXP3⁺ y las citocinas relacionadas con la respuesta Th17. (a) Correlación entre los niveles séricos de TGF β y las células CD25^{high}FOXP3⁺ en los controles sanos y en pacientes de LES (b) El porcentaje de células CD25^{high}FOXP3⁺ se correlaciona positivamente con la IL-17, IL-8 y negativamente con la IL-6 en pacientes de LES.

Por otro lado, los porcentajes de células CD25⁻ o CD25^{low} FOXP3⁺ no se asociaron con los niveles de ninguna de las citocinas testadas, lo que confirma los resultados obtenidos al analizar la producción ex vivo de citocinas.

5.3 DISCUSIÓN

En este capítulo se describen alteraciones significativas en la población de células FOXP3⁺ de los pacientes lúpicos que podrían permitir alcanzar un mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad.

En primer lugar, se encontró que las células CD25⁻FOXP3⁺ estaban significativamente elevadas en los pacientes de LES en comparación con los controles, apoyando la idea de que la expresión de FOXP3 está disociada de la de CD25. Este resultado concuerda con trabajos previos que han mostrado que la presencia de células FOXP3⁺ sin expresión de CD25 podría ser una característica típica del LES (189-192). Sin embargo, el origen de esta población y la razón por la que está aumentada en el lupus son aún cuestiones sin resolver. Es importante resaltar que estas células están presentes de forma habitual en todos los individuos; de hecho, aproximadamente la mitad de todas las células CD4⁺FOXP3⁺ de nuestro grupo de donantes sanos pertenece a la subpoblación CD25⁻, y este número se incrementa hasta un 70% en el caso de los pacientes. El aumento podría ser debido a cambios en el estado de activación de los pacientes o estar relacionado con alguna característica clínica, aunque –al contrario que otros autores (189, 192, 197) – en el presente estudio no se encontró ninguna asociación con la actividad de la enfermedad. Los datos aquí mostrados parecen sugerir que el aumento en esta población está influenciado por la progresión de la enfermedad, ya que la proporción de células FOXP3⁺ dentro de la población CD25⁻ no está alterada en pacientes de diagnóstico reciente. En vista de estos datos se puede hipotetizar que la expresión de FOXP3 en las células CD25⁻ podría ser un mecanismo autoregulator para

inducir anergia en las células T, una función asociada a FOXP3, incluso en células no supresoras (76).

Los resultados procedentes de este capítulo también muestran que este incremento está asociado con el descenso del número de linfocitos T CD4⁺. La correlación encontrada entre el porcentaje de CD4⁺ y FOXP3⁺ ($r=-0.421$, $p<0.0001$) sugiere que el incremento en el tamaño de la población CD25⁺FOXP3⁺ en el lupus podría ser debido a una elevada resistencia a la apoptosis de estas poblaciones. Aunque, en general, la apoptosis está incrementada en el lupus, esta parece afectar preferentemente a los linfocitos vírgenes (CD4⁺CD45RA⁺)(198, 199), lo que explicaría la correlación negativa encontrada entre la proporción de linfocitos CD4⁺ y CD25⁺CD45RO⁺. Además, gran parte de las células CD25⁺FOXP3⁺ son CD45RO⁺, mientras que, en individuos sanos, expresan mayoritariamente la isoforma CD45RA (191, 197).

Por otro lado, es factible que los resultados publicados por la mayoría de autores que muestran un incremento en la población de células CD25⁺FOXP3⁺ pueda también ser explicado por la progresión de la enfermedad, si se tiene en cuenta que estos estudios no incluyen pacientes de diagnóstico reciente. Sin embargo, el trabajo de Zhang et al. (192) muestra también este incremento en pacientes de inicio sin tratamiento. La discrepancia entre los resultados aquí expuestos y los publicados por Zhang et al. podría explicarse en parte por el tratamiento, ya que algunos de nuestros pacientes de diagnóstico reciente se encontraban medicados, y se ha demostrado que el número de células CD25⁺FOXP3⁺ decrece en la mayoría de los pacientes activos tras tratamiento (192). Por otro lado la población de células CD25⁺FOXP3⁺ descrita por Zhang et al. podría incluir linfocitos activados (CD25^{low}FOXP3⁺), ya que los autores no diferencian entre células CD25⁺ y CD25^{low}. Dado que en los linfocitos CD4⁺ humanos la expresión de CD25 es un continuo, es difícil estandarizar un punto de corte para definir las subpoblaciones CD25^{low} y CD25^{high} –dificultad que sin duda

se ve agrandada por el uso de diferentes anticuerpos monoclonales-. De hecho, el grupo de pacientes de reciente diagnóstico de nuestra cohorte tenía el porcentaje más alto de células CD25^{low}FOXP3⁺.

En cuanto a la cuantificación de las células Th productoras de citocinas, su estudio permitió evaluar la función supresora de las diferentes poblaciones FOXP3⁺. En primer lugar, se confirmó la habilidad de las células Treg convencionales (CD25^{high}FOXP3⁺) de individuos sanos para regular las respuestas efectoras, principalmente la Th1 (producción de IFN γ y TNF α). Cada vez existen más evidencias de que las alteraciones funcionales de las células Treg que les impiden controlar de forma efectiva la producción de citocinas están relacionadas con el desarrollo o empeoramiento del lupus. De hecho, a pesar de que la frecuencia de células CD25^{high}FOXP3⁺ fue normal en los pacientes, los datos del presente trabajo muestran evidencias de su disfuncionalidad, ya que las correlaciones negativas entre el número de células Treg y las células productoras de IFN γ , TNF α o IL-10 que se encontraron en los controles no estaban presentes al analizar los datos de los pacientes lúpicos.

Por otro lado, la ausencia de correlaciones entre las células CD25^{-/low}FOXP3⁺ y los linfocitos productores de citocinas en los controles sanos sugiere que estas subpoblaciones no están involucradas en el control de las citocinas derivadas de los linfocitos T helper. Dos grupos de investigación han intentado determinar la funcionalidad de las células CD25⁻FOXP3⁺ (197, 200), alcanzando conclusiones distintas. El principal problema a la hora de determinar la capacidad para inhibir la proliferación es la imposibilidad de aislarlas. Una aproximación inicial podría ser separar las células CD25⁻CD127^{-/low}, pero dado que la expresión de CD127 disminuye tras la activación, los resultados obtenidos al analizar la funcionalidad de las células CD25⁻CD127^{-/low} no puede ser extrapolados a lo que ocurriría con las células CD25⁻FOXP3⁺. De hecho, los resultados mostrados en este capítulo evidencian que CD127 no puede ser utilizado como un sustituto de FOXP3, ya que las

diferencias entre los porcentajes de células FOXP3⁺ y CD127^{-/low} dentro de las subpoblaciones CD25⁻ y CD25^{low} fueron claramente distintos (Tabla 5.2)

Por último, los resultados mostrados en este capítulo proveen evidencias muy interesantes de las alteraciones de las células CD25^{high}FOXP3⁺ en el lupus. Las células CD25^{high} de los pacientes activos tienden a producir más IL-17 que las de los controles y presentan un ratio FOXP3⁺/IL-17⁺ significativamente disminuido en comparación con los individuos sanos. Además, el balance de producción de citocinas por parte de las células CD25^{high} está también desregulado en los pacientes, demostrado por el hecho de que los ratios IL-17⁺/IFN γ ⁺ e IL-17⁺/TNF α ⁺ fueron significativamente mayores en los pacientes. Tomados en conjunto, estos datos parecen indicar que las células CD25^{high} de los pacientes de LES tienden a ser “Th17”, una idea que concuerda con la tendencia general del lupus a desarrollar una respuesta Th17 (139, 168, 169).

Aunque aún se desconoce el mecanismo mediante el cual las células Treg se “trans-diferencian” a células Th17, la deficiencia en TGF β y los altos niveles de IL-6 encontrados en el suero de los pacientes podría ser una hipótesis válida para explicarlo. De hecho, la IL-6 ha demostrado ser capaz de disminuir la funcionalidad de las células Treg (201, 202) e incluso transformarlas en células capaces de producir IL-17 (203), mientras que una adecuada concentración de TGF β está relacionada con el desarrollo y mantenimiento de las células Treg. De hecho, los niveles de TGF β parecen ser cruciales a la hora de mantener un adecuado balance Treg/Th17, ya que altas concentraciones de esta citocina promueven el desarrollo de células Treg mientras que concentraciones bajas son necesarias para generar células Th17 (204). Si, efectivamente, la conversión de células Treg en Th17 ocurriese en el LES, podría explicar la correlación positiva encontrada entre el número de células CD25^{high}FOXP3⁺ y los niveles séricos de IL-17. Aunque esta

relación puede resultar sorprendente, está de acuerdo con hallazgos previos que muestran una considerable plasticidad entre las células Treg y Th17 (102, 193, 194, 201, 202).

En resumen, en este capítulo se describen características fenotípicas y funcionales importantes de las células FOXP3⁺ de los pacientes de LES. El aumento en la población CD25-FOXP3⁺, relacionada con el progreso de la enfermedad y con el descenso en el número de células T CD4⁺, sugiere un posible mecanismo autoregulador para inducir anergia o muerte selectiva en determinadas subpoblaciones. Por otro lado, aunque la frecuencia de células CD25^{high} FOXP3⁺ en el LES es normal, su funcionalidad parece estar afectada. Finalmente, el aumento del número de células productoras de IL-17 dentro de la población CD25^{high} y la correlación positiva entre los niveles séricos de IL-17 y el número de Treg sugiere que las células Treg de los pacientes de LES tienden a convertirse en células Th17, pudiendo ser las células CD25^{high} IL-17⁺ un estadio intermedio de “trans-diferenciación”.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Las células T reguladoras juegan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia periférica. Existen claras evidencias de que las deficiencias en el número y/o función de las células Treg pueden producir el desarrollo de autoinmunidad, alergia y rechazo de órganos, mientras que el aumento en el número de esta población inhibe la inmunidad contra tumores y patógenos. Los estudios realizados en modelos murinos han demostrado que la manipulación del número o función de las células Treg puede ayudar al control de numerosas patologías, por lo que la transferencia adoptiva de células Treg ha sido considerada una terapia prometedora para el tratamiento de estos desórdenes. Sin embargo, la inmunoterapia con células Treg posee numerosas limitaciones. Dado el escaso número de células Treg presentes en sangre periférica, su utilización en terapia requiere pasos previos de expansión *in vitro*. La generación de células Treg a partir de linfocitos T no reguladores constituye una alternativa, pero en ambos casos se requiere una fuerte estimulación a través del TCR y altas dosis de IL-2, lo cual puede dar lugar a la generación de células activadas.

Algunos estudios han utilizado determinados agentes para tratar de generar células Treg o expandirlas. Entre ellos, la rapamicina ha demostrado ser capaz de incrementar la expresión de FOXP3 en células T CD4⁺ vírgenes tratadas con TGFβ e IL-2 e inducir actividad supresora (205, 206). Las células Treg, al contrario que las células efectoras, funcionan adecuadamente en presencia de rapamicina, de tal manera que poseen una resistencia natural a este inmunosupresor, permitiendo su expansión preferente. Más recientemente se ha comenzado a estudiar el efecto del ácido retinoico (207), un derivado de la vitamina A que promueve la expansión y generación de novo de células Treg. Sin embargo, los estudios realizados con células humanas indican que, aunque el ácido retinoico es capaz de incrementar la expresión de FOXP3 y la actividad supresora, su efecto es transitorio (207).

Un efecto similar al producido por estos agentes se podría esperar de los corticoides, ya que numerosos estudios han demostrado su capacidad para aumentar la expresión de CD25 y FOXP3 tanto in vivo como in vitro. Desafortunadamente, y a pesar de las expectativas creadas, los GC no parecen ser capaces de expandir o generar de novo células Treg para su utilización terapéutica, aunque sí generan células anérgicas. El papel de la expresión de FOXP3 en linfocitos T activados sin capacidad reguladora aún no ha sido clarificado. Algunos autores (90) han sugerido que la función de FOXP3 sería suprimir los genes que se activan con la estimulación de la célula T (bien directa o indirectamente), en una especie de mecanismo homeostático o “autorregulador”. Esta teoría estaría avalada por los estudios que demuestran que FOXP3 es capaz de interactuar y reprimir la actividad transcripcional de NFAT y NF- κ B (83), así como por el hecho de que la expresión de FOXP3 en células T no reguladoras ocurra de forma transitoria. Según este modelo, el aumento en la expresión de FOXP3 producido por los corticoides sería un mecanismo más mediante el cual estos agentes terapéuticos ejercerían su actividad inmunosupresora, atenuando las funciones efectoras de las células T activadas.

Antes de la infusión terapéutica de productos celulares es muy importante demostrar la esterilidad, identidad, pureza y funcionalidad de los mismos. En la actualidad, la demostración de la pureza de las células Treg resulta aún compleja debido a la ausencia de un marcador específico para esta población celular. Hasta la fecha, FOXP3 ha sido utilizado como el marcador más característico de las células reguladoras y se ha usado para la caracterización y cuantificación de esta población en individuos sanos y pacientes de diferentes patologías. Sin embargo, la ausencia de correlación entre la expresión de FOXP3 y la actividad reguladora observada en este trabajo sugiere que el uso de FOXP3 como marcador de células reguladoras debe realizarse con cautela.

Por otro lado, las células Treg muestran una gran variedad de mecanismos funcionales que se ejercen sobre un gran número de poblaciones celulares, por lo que la medida de su actividad funcional supondría, en realidad, la realización de numerosos ensayos, entre ellos inhibición de la proliferación de células T, inhibición de la producción de citocinas, citotoxicidad y supresión de la maduración de las células presentadoras de antígeno. Aparte de todos estos mecanismos funcionales, es más que probable que las células Treg ejerzan otras acciones, aún desconocidas, que no se podrían evaluar. Más aún, es difícil asegurar que los test para determinar la actividad funcional de las células Treg *in vitro* refleje fielmente la actividad *in vivo*, por lo que desarrollar un test *in vitro* que asegure la funcionalidad *in vivo* y que, por tanto, pueda garantizar la calidad de las células Treg expandidas o generadas *in vitro*, será uno de los retos a los que habrá que enfrentarse en los próximos años si se desea avanzar en el uso clínico las células Treg.

Otros posibles problemas que pueden presentarse con uso de las células Treg generadas o expandidas *in vitro* son los derivados de la plasticidad mostrada por esta población celular. La estabilidad del fenotipo y función de las células Treg resulta de mucha importancia para asegurarse de que estas células son capaces de controlar las enfermedades inflamatorias. Sin embargo, no es de extrañar que bajo algunas circunstancias, el sistema inmune deba “regular” a las células reguladoras, de tal manera que se facilite el desarrollo de la respuesta inmune más adecuada en cada momento. La conversión de las células Treg en células T efectoras inducida por determinados estímulos inflamatorios podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales el sistema inmune garantiza la respuesta efectiva frente a los patógenos. Sin embargo, la existencia de estos fenómenos de transdiferenciación pueden plantear problemas en el caso de que las células Treg quieran ser utilizadas en terapia celular. Estas células pueden transformarse en

células productoras de IL-17 –potencialmente patogénicas– cuando se encuentran en un ambiente pro-inflamatorio que suponga una señal de peligro para el sistema inmune, o perder la expresión de FOXP3 y transformarse en linfocitos T convencionales. Este punto debe ser especialmente tenido en cuenta en el caso de que la terapia con células Treg quiera ser aplicada en el LES, ya que el ambiente de citocinas propio del LES es paradigmático de la respuesta Th17 –altos niveles de IL-6 e IL-1 β y bajos de IL-2 y TGF- β –. Como sugieren los resultados de esta tesis doctoral, las células Treg de los pacientes de LES con mayor actividad parecen tener una mayor propensión a convertirse en células Th17 (debido probablemente al ambiente de citocinas) que las células de los individuos sanos. Esta tendencia podría ocasionar que las células Treg infundidas en estos pacientes se convirtieran en células Th17, las cuales podrían contribuir al agravamiento de la enfermedad más que a su resolución. La propensión de las células Treg a convertirse en células Th17 en presencia de mediadores de la inflamación es una realidad que deberá ser tomada en cuenta para la utilización de las células Treg en terapia celular. El entendimiento de los mecanismos de transdiferenciación y de la relación entre células Treg y Th17 –más compleja de lo que inicialmente se había pensado– es aún muy rudimentario y será necesario profundizar en estos aspectos para garantizar la eficacia y seguridad de la terapia con células Treg.

Por otro lado, la ausencia de correlaciones negativas entre el número de células Treg y las células Th productoras de citocinas en los pacientes de LES –correlaciones que sí están presentes en los controles sanos– sugiere que las células Treg de los enfermos de lupus son disfuncionales. Nuestras propias observaciones y las realizadas por otros grupos de investigación sugieren que la presencia de citocinas pro-inflamatorias, en particular IL-6, IL-1 β y TNF- α , puede inhibir la actividad supresora de las células Treg. Tanto la IL-6 como la IL-1 β pueden bloquear la función antiproliferativa de las células Treg (208,

209) El TNF- α , por su parte, también afecta a la funcionalidad de las células Treg, como parece demostrarse por el hecho de que la terapia anti TNF- α en pacientes de artritis reumatoide sea capaz de restaurar su funcionalidad (210). ¿Pueden estas células, una vez modificadas por la presencia de citocinas pro-inflamatorias, volver a su estado de células reguladoras o, por el contrario, experimentan un cambio permanente diferenciándose terminalmente en otro linaje? Esta pregunta aún permanece sin respuesta, pero la existencia de células Treg latentes o inactivas ha sido propuesta por algunos autores. Concretamente, se ha sugerido que las células CD25⁻FOXP3⁺ podrían constituir un reservorio de células T reguladoras que, tras estimulación, podrían recuperar la expresión de CD25 y convertirse en células Treg totalmente funcionales (211, 212). Esto explicaría el hecho de que en algunos cohortes de pacientes de LES se haya encontrado una correlación positiva entre el número de células CD25⁺FOXP3⁺ y la actividad de la enfermedad. El reclutamiento de células CD25⁻FOXP3⁺ para expandir el pool de células Treg sería un mecanismo para salvaguardar la homeostasis inmunológica –un intento de controlar las respuestas efectoras agresivas desarrolladas por las células T y B durante el brote de la enfermedad–. Por otro lado, la presencia de un gran número de células FOXP3⁺ en la población CD4⁺CD25⁻ deberá ser tenido en cuenta en los estudios futuros en los que se aborde la funcionalidad de las células Treg en el LES. Las células CD4⁺CD25⁻ autólogas son utilizadas habitualmente como células respondedoras en los experimentos para determinar la capacidad inhibidora de la proliferación de las células Treg. La disminución de la capacidad supresora de las células Treg descrita por algunos autores en el LES podría explicarse por el hecho de que las células efectoras (CD4⁺CD25⁻) proliferan menos que las de los individuos sanos, lo que complicaría las conclusiones que se puedan derivar de los resultados obtenidos.

A pesar de los avances realizados en los últimos años aún existen muchas controversias sobre la naturaleza y función de las células CD25-FOXP3⁺ que, por otra parte, parecen desempeñar una función fisiológica, ya que están presentes en los individuos sanos. Los resultados derivados de esta tesis proporcionan evidencias indirectas de que estas células no son células reguladoras, idea avalada por otros grupos de investigación. Dado el papel que FOXP3 parece jugar en la inducción de anergia, es posible que la expresión de este factor de transcripción represente la tendencia de estas células a permanecer hiporespondedoras al estímulo a través del TCR más que indicar que estas células poseen actividad reguladora. De nuevo, la ausencia de un marcador de membrana exclusivo de esta población limita las conclusiones que se pueden derivar de los estudios actuales. La expresión de CD127 se ha utilizado para tratar de aislar la subpoblación CD25-Foxp3⁺, pero desafortunadamente, los resultados mostrados por otros autores y los presentados en esta tesis indican que este marcador de membrana no puede considerarse un buen subrogado de FOXP3.

Uno de los resultados más interesantes presentado en esta tesis doctoral es el hecho de que los pacientes tratados con corticoides muestren un porcentaje de células Th17 significativamente mayor que los pacientes no tratados con estos agentes o los controles sanos. Aunque sin duda sorprendente, existen algunas evidencias que podrían constituir una explicación para este fenómeno. Los GC han sido utilizados como agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores en muchas enfermedades autoinmunes y alérgicas, así como en trasplante. Estas sustancias son capaces de controlar la respuesta inmune en muchos niveles distintos aunque también es cierto que estos agentes inmunosupresores tienen numerosos efectos secundarios, algunos de los cuales guardan relación con su acción mineralocorticoide. El efecto de los esteroides sobre la producción de IL-17 y la generación de células Th17 se ha estudiado en un número

limitado de trabajos. Herrada AA et al. (213) muestran que la aldosterona –el mineralocorticoide por excelencia– incrementa la capacidad de las células dendríticas para inducir la polarización de las células CD4⁺ hacia células Th17 ya que las estimula a producir mayor cantidad de IL-6 y TGFβ. En consonancia con este resultado, los autores demuestran que la aldosterona exagera los síntomas de la encefalitis autoinmune experimental y promueve la producción de IL-17 por parte de las células T específicas de mielina. Este resultado es mediado por el receptor de mineralocorticoides, ya que el efecto de la aldosterona sobre la producción de IL-17 puede ser bloqueado con el uso de inhibidores competitivos o antagonistas del receptor (213). Más aún, el uso de inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona ha demostrado ser eficaz en la supresión de la artritis inducida por colágeno(214) y de la EAE (215), suprimiendo la producción de citocinas Th1 y Th17 y promoviendo la generación de células T reguladoras CD4⁺FOXP3⁺ antígeno específicas (216). Su efecto también se ha estudiado en la enfermedad pulmonar obstructiva inducida en ratones, demostrando que estos inhibidores suprimen la producción de TNFα, IL-6 e IL-17 (217). Los resultados de estos artículos están en completa consonancia con el efecto mostrado por la progesterona, hormona conocida por ser un potente antagonista del receptor de mineralocorticoides. Durante el embarazo, las células Treg juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la tolerancia materno-fetal. El tamaño de esta población aumenta durante la gestación, tanto en la madre como en el feto, -aumento que se relaciona con los niveles de progesterona- (218, 219). La progesterona ha demostrado ser capaz de promover la diferenciación de células T CD4⁺ de cordón umbilical en células Treg y suprimir la diferenciación a células Th17 (220). Es interesante resaltar que el mecanismo mediante el cual la progesterona impide la generación de células Th17 implica la inhibición de la expresión del receptor de la IL-6 y de STAT3 (220). En esta tesis doctoral se propone un posible mecanismo mediante el cual los GC

podrían aumentar la producción de IL-17, mecanismo en el que también están involucrados IL-6R y STAT3.

Tradicionalmente se pensaba que el receptor de mineralocorticoide podía ser únicamente activado por la aldosterona y que su principal acción era la retención de sodio y la excreción de potasio. Sin embargo, es bien sabido que los glucocorticoides pueden también ser ligandos del receptor de mineralocorticoides y producir los efectos clásicos de la activación de este receptor. De hecho, el receptor de mineralocorticoides muestra la misma afinidad por el cortisol – hormona considerada clásicamente un glucocorticoide-, que por la aldosterona (221). Es por ello que en los túbulos renales es necesaria la existencia de mecanismos que controlen el acceso del cortisol al receptor de mineralocorticoides (221) La 11 β hidroxiesteroide dehidrogenasa 2(11 β -HSD) es el enzima encargada de controlar la unión de los glucocorticoides en los receptores de mineralocorticoides. Este enzima está distribuída en los tejidos diana de los mineralocorticoides y convierte el cortisol en cortisona; de esta manera, evita que los receptores de mineralocorticoides sean ocupados por cortisol.

Un aspecto importante a tener en cuenta es que el efecto mineralocorticoide de los glucocorticoides no sólo depende de la naturaleza química del compuesto, si no de la dosis e incluso de la vía de administración. En general, a dosis bajas de glucocorticoides se esperaran efectos mineralocorticoides reducidos, y a altas dosis de glucocorticoides se producen efectos mineralocorticoides mayores. Esto podría explicar la razón por la que sólo los pacientes de lupus tratados con dosis superiores a 5 mg/día de prednisona muestran un incremento en el número de células Th17.

Puesto que prácticamente todos los GC pueden tener cierta potencia mineralocorticoide, no sería de extrañar que el efecto observado del

tratamiento con GC en la producción de IL-17 estuviera mediado por la unión al receptor de mineralocorticoides. La mayor parte de los pacientes estudiados en la presente tesis se encontraban bajo tratamiento con prednisona, un corticoide conocido por su baja – aunque no nula – potencia mineralocorticoide.

Sin duda, será necesario realizar otros estudios que permitan confirmar o desmentir esta hipótesis. Estos estudios podrían incluir experimentos *in vitro* en los que se testara la capacidad de esteroides con diferente potencia mineralo/glucocorticoidea para generar células Th17 a partir de linfocitos T CD4 vírgenes. La progesterona y la aldosterona podrían utilizarse como “extremos” de este gradiente, ya que muestran efectos opuestos en la generación de células Th17. También sería interesante observar el efecto de la concentración sobre la producción de IL-17 y la posibilidad de generar células CD25⁺FOXP3⁺ funcionales.

El efecto de los GC en la producción de IL-17 *in vivo* deberá ser también estudiado cuidadosamente, ya que podría ser necesario tenerlo en cuenta cuando se pauten este tratamiento a los pacientes. Esto es especialmente cierto en los pacientes con anticuerpos anti-ENA positivos, que parecen mostrar una propensión natural a desarrollar una respuesta Th17 excesiva. Aunque es sabido que el origen de los distintos autoanticuerpos en el LES es diferente, la razón por la que la positividad para ENAs se relaciona con el exceso de producción de IL-17 no es fácilmente elucidable. Este descubrimiento señala a los ENAs como un posible biomarcador para predecir la tendencia al desarrollo de respuesta Th17, factor que deberá ser especialmente tenido en cuenta en caso de que se quiera tratar a estos pacientes con dosis altas de GC. En el futuro se deberá estudiar el efecto conjunto de la positividad para ENAs y el tratamiento con GC mediante la realización de un estudio longitudinal prospectivo, esperando que permita dilucidar la conveniencia de este tratamiento en estos pacientes.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1.- Dexamethasone pretreatment upregulates mRNA and protein expression of FOXP3 after in vitro expansion of CD4⁺CD25⁻ T cells, but it is ineffective in inducing suppressor activity.

2.- TGFβ treatment generates functional Treg cells from CD4⁺CD25⁻ lymphocytes. Dexamethasone pretreatment in these cells significantly upregulates FOXP3 levels without increasing suppressor ability.

3.- Th17 cells are increased and Th1 decreased in SLE patients under glucocorticoid therapy, leading to an impaired balance between these two populations. Th17/Th1 index correlates with SLEDAI score just in patients under glucocorticoid treatment.

4.- SLE patients receiving glucocorticoids display upregulated STAT3 and IL-6R gene expression, whereas no differences are detected in STAT4 and IL-12R levels. Th17/Th1 ratio correlates with STAT3 and IL-6R gene expression.

5.- Presence of anti-ENA antibodies (SSA, SSB, Sm or RNP) is associated with high Th17 response in SLE patients.

6.- CD25⁻FOXP3⁺ population is enhanced in SLE and associated with disease duration and low levels of CD4⁺ lymphocytes. In the bulk of CD25^{low} cells, the highest amount of FOXP3⁺ cells is displayed by recent onset SLE patients.

7.- Cytokine producing Th cells from healthy controls correlated negatively with CD25^{high} but not with CD25⁻ or CD25^{low} FOXP3⁺ populations, suggesting that conventional Treg cells are the unique FOXP3⁺ population with suppressor capability.

8.- CD25^{high}FOXP3⁺ cells from SLE patients seem to be dysfunctional: they do not correlate with cytokine producing cells and the ratio IL-

17⁺/FOXP3⁺ within the bulk of CD25^{high} cells is significantly increased in active patients.

9.- Lupus patients display higher serum concentration of IL-6, IL-8 and GM-CSF and lower of TGFβ than healthy controls. CD25^{high}FOXP3⁺ cells correlate positively with TGFβ in controls but not in patients. Instead, Treg cells in SLE patients correlate positively with serum levels of IL-17 and IL-8 and negatively with IL-6.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS

1. Parish, C. R., and F. Y. Liew. 1972. Immune response to chemically modified flagellin. 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. *J Exp Med* 135:298-311.
2. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
3. Gershon, R. K., and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723-737.
4. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. 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* 155:1151-1164.
5. Cheng, J., A. Montecalvo, and L. P. Kane. Regulation of NF-kappaB induction by TCR/CD28. *Immunol Res* 50:113-117.
6. Macian, F., C. Garcia-Rodriguez, and A. Rao. 2000. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J* 19:4783-4795.
7. Thieu, V. T., Q. Yu, H. C. Chang, N. Yeh, E. T. Nguyen, S. Sehra, and M. H. Kaplan. 2008. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 29:679-690.
8. Yagi, R., J. Zhu, and W. E. Paul. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol* 23:415-420.

9. Ouyang, W., M. Lohning, Z. Gao, M. Assenmacher, S. Ranganath, A. Radbruch, and K. M. Murphy. 2000. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12:27-37.
10. Nishihara, M., H. Ogura, N. Ueda, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, F. Tsuji, H. Aono, K. Ishihara, E. Huseby, U. A. Betz, M. Murakami, and T. Hirano. 2007. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol* 19:695-702.
11. Wei, L., A. Laurence, K. M. Elias, and J. J. O'Shea. 2007. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 282:34605-34610.
12. Yang, X. O., A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich, and C. Dong. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282:9358-9363.
13. Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten, and C. Dong. 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28:29-39.
14. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
15. Conti, H. R., F. Shen, N. Nayyar, E. Stocum, J. N. Sun, M. J. Lindemann, A. W. Ho, J. H. Hai, J. J. Yu, J. W. Jung, S. G. Filler, P. Masso-Welch, M. Edgerton, and S. L. Gaffen. 2009. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 206:299-311.
16. Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon, and J. K. Kolls. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for

- lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194:519-527.
17. Vanaudenaerde, B. M., W. A. Wuyts, L. J. Dupont, D. E. Van Raemdonck, M. M. Demedts, and G. M. Verleden. 2003. Interleukin-17 stimulates release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells in vitro: a potential role for interleukin-17 and airway smooth muscle cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 22:1280-1283.
 18. Lee, J. W., P. Wang, M. G. Kattah, S. Youssef, L. Steinman, K. DeFea, and D. S. Straus. 2008. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol* 181:6536-6545.
 19. Ye, P., P. B. Garvey, P. Zhang, S. Nelson, G. Bagby, W. R. Summer, P. Schwarzenberger, J. E. Shellito, and J. K. Kolls. 2001. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:335-340.
 20. Kim, J. S., J. E. Smith-Garvin, G. A. Koretzky, and M. S. Jordan. The requirements for natural Th17 cell development are distinct from those of conventional Th17 cells. *J Exp Med* 208:2201-2207.
 21. Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ effector T cells. *Nat Immunol* 9:1347-1355.
 22. Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9:1341-1346.
 23. Nowak, E. C., C. T. Weaver, H. Turner, S. Begum-Haque, B. Becher, B. Schreiner, A. J. Coyle, L. H. Kasper, and R. J. Noelle. 2009. IL-9

- as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* 206:1653-1660.
24. Elyaman, W., E. M. Bradshaw, C. Uyttenhove, V. Dardalhon, A. Awasthi, J. Imitola, E. Bettelli, M. Oukka, J. van Snick, J. C. Renauld, V. K. Kuchroo, and S. J. Khoury. 2009. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12885-12890.
 25. Duhon, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10:857-863.
 26. Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin, and H. Spits. 2009. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 10:864-871.
 27. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
 28. Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Hohenbeck, M. A. Lerman, A. Naji, and A. J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2:301-306.
 29. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
 30. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
 31. Josefowicz, S. Z., and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616-625.

32. Hogquist, K. A., and A. E. Moran. 2009. Treg cells meet their limit. *Nat Immunol* 10:565-566.
33. Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6:152-162.
34. Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
35. Nazarov-Stoica, C., J. Surls, C. Bona, S. Casares, and T. D. Brumeanu. 2009. CD28 signaling in T regulatory precursors requires p56lck and rafts integrity to stabilize the Foxp3 message. *J Immunol* 182:102-110.
36. Malek, T. R., A. Yu, L. Zhu, T. Matsutani, D. Adeegbe, and A. L. Bayer. 2008. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol* 28:635-639.
37. Lio, C. W., and C. S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
38. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-1310.
39. Hoffmann, H. J., T. M. Malling, A. Topcu, L. P. Ryder, K. R. Nielsen, K. Varming, R. Dahl, O. Omland, and T. Sigsgaard. 2007. CD4^{dim}CD25^{bright} Treg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytometry A* 71:371-378.
40. Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler, and J. A. Bluestone. 2006.

- CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701-1711.
41. Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693-1700.
 42. Miyara, M., and S. Sakaguchi. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13:108-116.
 43. Thornton, A. M., C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* 34:366-376.
 44. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164:183-190.
 45. Birebent, B., R. Lorho, H. Lechartier, S. de Guibert, M. Alizadeh, N. Vu, A. Beauplet, N. Robillard, and G. Semana. 2004. Suppressive properties of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol* 34:3485-3496.
 46. Kataoka, H., S. Takahashi, K. Takase, S. Yamasaki, T. Yokosuka, T. Koike, and T. Saito. 2005. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol* 17:421-427.
 47. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629-644.
 48. Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E. M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the

- absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196:237-246.
49. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589-601.
50. Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110:1225-1232.
51. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
52. Kitani, A., K. Chua, K. Nakamura, and W. Strober. 2000. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 165:691-702.
53. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
54. Holler, E., M. G. Roncarolo, R. Hintermeier-Knabe, G. Eissner, B. Ertl, U. Schulz, H. Knabe, H. J. Kolb, R. Andreesen, and W. Wilmanns. 2000. Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25:237-241.
55. VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, E. Jankowska-Gan, T. Chin, S. Kusaka, F. Geissler, R. P. Pelletier, and C. G. Orosz. 2000. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 106:145-155.

56. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.
57. Miller, A., O. Lider, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and H. L. Weiner. 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:421-425.
58. Suto, A., H. Nakajima, K. Ikeda, S. Kubo, T. Nakayama, M. Taniguchi, Y. Saito, and I. Iwamoto. 2002. CD4(+)CD25(+) T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. *Blood* 99:555-560.
59. Thorstenson, K. M., and A. Khoruts. 2001. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 167:188-195.
60. Grundstrom, S., L. Cederbom, A. Sundstedt, P. Scheipers, and F. Ivars. 2003. Superantigen-induced regulatory T cells display different suppressive functions in the presence or absence of natural CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Immunol* 170:5008-5017.
61. Taams, L. S., M. Vukmanovic-Stejic, J. Smith, P. J. Dunne, J. M. Fletcher, F. J. Plunkett, S. B. Ebeling, G. Lombardi, M. H. Rustin, J. W. Bijlsma, F. P. Lafeber, M. Salmon, and A. N. Akbar. 2002. Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 32:1621-1630.
62. Walker, M. R., D. J. Kasprovicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner, and S. F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112:1437-1443.

63. Valencic, E., E. Piscianz, A. Tommasini, and M. Granzotto. 2007. T cells stimulated in vitro have a suppressive function but do not contain only regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 150:561-566.
64. Abraham, M., A. Karni, A. Dembinsky, A. Miller, R. Gandhi, D. Anderson, and H. L. Weiner. 2008. In vitro induction of regulatory T cells by anti-CD3 antibody in humans. *J Autoimmun* 30:21-28.
65. Verhasselt, V., O. Vosters, C. Beuneu, C. Nicaise, P. Stordeur, and M. Goldman. 2004. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* 34:762-772.
66. Walker, M. R., B. D. Carson, G. T. Nepom, S. F. Ziegler, and J. H. Buckner. 2005. De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4103-4108.
67. Mahic, M., S. Yaqub, T. Bryn, K. Henjum, D. M. Eide, K. M. Torgersen, E. M. Aandahl, and K. Tasken. 2008. Differentiation of naive CD4+ T cells into CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *J Leukoc Biol* 83:1111-1117.
68. Park, H. B., D. J. Paik, E. Jang, S. Hong, and J. Youn. 2004. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells. *Int Immunol* 16:1203-1213.
69. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
70. Pyzik, M., and C. A. Piccirillo. 2007. TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol* 82:335-346.

71. Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149-5153.
72. Rao, P. E., A. L. Petrone, and P. D. Ponath. 2005. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J Immunol* 174:1446-1455.
73. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
74. Mantel, P. Y., N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, R. Welz, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176:3593-3602.
75. Passerini, L., S. E. Allan, M. Battaglia, S. Di Nunzio, A. N. Alstad, M. K. Levings, M. G. Roncarolo, and R. Bacchetta. 2008. STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- effector T cells. *Int Immunol* 20:421-431.
76. Wang, J., A. Ioan-Facsinay, E. I. van der Voort, T. W. Huizinga, and R. E. Toes. 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 37:129-138.
77. Pillai, V., S. B. Ortega, C. K. Wang, and N. J. Karandikar. 2007. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol* 123:18-29.
78. Baron, U., S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grutzkau, J. Dong, A. Thiel, T. J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Turbachova, A. Hamann, S. Olek, and J. Huehn. 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates

- regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37:2378-2389.
79. Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H. D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e38.
80. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
81. Ziegler, S. F. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24:209-226.
82. Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, A. Kas, T. T. Chu, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2007. Genome-wide analysis of *Foxp3* target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936-940.
83. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. *Foxp3* interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5138-5143.
84. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
85. Li, B., S. J. Saouaf, A. Samanta, Y. Shen, W. W. Hancock, and M. I. Greene. 2007. Biochemistry and therapeutic implications of mechanisms involved in FOXP3 activity in immune suppression. *Curr Opin Immunol* 19:583-588.
86. Ichiyama, K., H. Yoshida, Y. Wakabayashi, T. Chinen, K. Saeki, M. Nakaya, G. Takaesu, S. Hori, A. Yoshimura, and T. Kobayashi. 2008. *Foxp3* inhibits ROR γ mat-mediated IL-17A mRNA

- transcription through direct interaction with ROR γ mat. *J Biol Chem* 283:17003-17008.
87. Allan, S. E., S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo, and M. K. Levings. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19:345-354.
 88. Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs, and A. Y. Rudensky. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6659-6664.
 89. Allan, S. E., L. Passerini, R. Bacchetta, N. Crellin, M. Dai, P. C. Orban, S. F. Ziegler, M. G. Roncarolo, and M. K. Levings. 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* 115:3276-3284.
 90. Ziegler, S. F. 2007. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol* 37:21-23.
 91. Bacchetta, R., L. Passerini, E. Gambineri, M. Dai, S. E. Allan, L. Perroni, F. Dagna-Bricarelli, C. Sartirana, S. Matthes-Martin, A. Lawitschka, C. Azzari, S. F. Ziegler, M. K. Levings, and M. G. Roncarolo. 2006. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 116:1713-1722.
 92. Usui, T., R. Nishikomori, A. Kitani, and W. Strober. 2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 18:415-428.
 93. Usui, T., J. C. Preiss, Y. Kanno, Z. J. Yao, J. H. Bream, J. J. O'Shea, and W. Strober. 2006. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* 203:755-766.

94. Hegazy, A. N., M. Peine, C. Helmstetter, I. Panse, A. Frohlich, A. Bergthaler, L. Flatz, D. D. Pinschewer, A. Radbruch, and M. Lohning. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 32:116-128.
95. Komatsu, N., M. E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann, and S. Hori. 2009. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1903-1908.
96. Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10:595-602.
97. Feng, T., A. T. Cao, C. T. Weaver, C. O. Elson, and Y. Cong. Interleukin-12 converts Foxp3+ regulatory T cells to interferon-gamma-producing Foxp3+ T cells that inhibit colitis. *Gastroenterology* 140:2031-2043.
98. Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J. M. Kim, T. T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein, and A. Y. Rudensky. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458:351-356.
99. Chaudhry, A., D. Rudra, P. Treuting, R. M. Samstein, Y. Liang, A. Kas, and A. Y. Rudensky. 2009. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326:986-991.
100. Voo, K. S., Y. H. Wang, F. R. Santori, C. Boggiano, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D. R. Littman, and Y. J. Liu. 2009. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4793-4798.

101. Hovhannisyan, Z., J. Treatman, D. R. Littman, and L. Mayer. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140:957-965.
102. Valmori, D., C. Raffin, I. Raimbaud, and M. Ayyoub. Human RORgammat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19402-19407.
103. Janeway CA, Travers P, Walport M, shlomchik MJ. Capítulo 13: Autoinmunidad y trasplante. En: Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 2ª ed. Barcelona. Ed. Masson. 2003. p. 501-52.
104. Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305.
105. Billingham, R. E., L. Brent, and P. B. Medawar. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603-606.
106. Graham, R. R., W. A. Ortmann, C. D. Langefeld, D. Jawaheer, S. A. Selby, P. R. Rodine, E. C. Baechler, K. E. Rohlf, K. B. Shark, K. J. Espe, L. E. Green, R. P. Nair, P. E. Stuart, J. T. Elder, R. A. King, K. L. Moser, P. M. Gaffney, T. L. Bugawan, H. A. Erlich, S. S. Rich, P. K. Gregersen, and T. W. Behrens. 2002. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 71:543-553.
107. Graham, R. R., W. Ortmann, P. Rodine, K. Espe, C. Langefeld, E. Lange, A. Williams, S. Beck, C. Kyogoku, K. Moser, P. Gaffney, P. K. Gregersen, L. A. Criswell, J. B. Harley, and T. W. Behrens. 2007. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *Eur J Hum Genet* 15:823-830.
108. Sullivan, K. E., N. A. Kim, D. Goldman, and M. A. Petri. 1999. C4A deficiency due to a 2 bp insertion is increased in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 26:2144-2147.

109. Kozyrev, S. V., A. K. Abelson, J. Wojcik, A. Zaghlool, M. V. Linga Reddy, E. Sanchez, I. Gunnarsson, E. Svenungsson, G. Sturfelt, A. Jonsen, L. Truedsson, B. A. Pons-Estel, T. Witte, S. D'Alfonso, N. Barizzone, M. G. Danieli, C. Gutierrez, A. Suarez, P. Junker, H. Laustrup, M. F. Gonzalez-Escribano, J. Martin, H. Abderrahim, and M. E. Alarcon-Riquelme. 2008. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 40:211-216.
110. Castillejo-Lopez, C., A. M. Delgado-Vega, J. Wojcik, S. V. Kozyrev, E. Thavathiru, Y. Y. Wu, E. Sanchez, D. Pollmann, J. R. Lopez-Egido, S. Fineschi, N. Dominguez, R. Lu, J. A. James, J. T. Merrill, J. A. Kelly, K. M. Kaufman, K. L. Moser, G. Gilkeson, J. Frostegard, B. A. Pons-Estel, S. D'Alfonso, T. Witte, J. L. Callejas, J. B. Harley, P. M. Gaffney, J. Martin, J. M. Guthridge, and M. E. Alarcon-Riquelme. Genetic and physical interaction of the B-cell systemic lupus erythematosus-associated genes BANK1 and BLK. *Ann Rheum Dis* 71:136-142.
111. Hughes, T., X. Kim-Howard, J. A. Kelly, K. M. Kaufman, C. D. Langefeld, J. Ziegler, E. Sanchez, R. P. Kimberly, J. C. Edberg, R. Ramsey-Goldman, M. Petri, J. D. Reveille, J. Martin, E. E. Brown, L. M. Vila, G. S. Alarcon, J. A. James, G. S. Gilkeson, K. L. Moser, P. M. Gaffney, J. T. Merrill, T. J. Vyse, M. E. Alarcon-Riquelme, S. K. Nath, J. B. Harley, and A. H. Sawalha. Fine-mapping and transethnic genotyping establish IL2/IL21 genetic association with lupus and localize this genetic effect to IL21. *Arthritis Rheum* 63:1689-1697.
112. Suarez, A., P. Lopez, L. Mozo, and C. Gutierrez. 2005. Differential effect of IL10 and TNF{alpha} genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 64:1605-1610.
113. Graham, R. R., S. V. Kozyrev, E. C. Baechler, M. V. Reddy, R. M. Plenge, J. W. Bauer, W. A. Ortmann, T. Koeth, M. F. Gonzalez

- Escribano, B. Pons-Estel, M. Petri, M. Daly, P. K. Gregersen, J. Martin, D. Altshuler, T. W. Behrens, and M. E. Alarcon-Riquelme. 2006. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 38:550-555.
114. Gómez J. Lupus Eritematoso Sistémico. Aspectos clínico-epidemiológicos, patogénicos y de seguimiento. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. 2011.
115. Gutiérrez C, Díaz JB, Gómez J (Coord.). Lupus Eritematoso Sistémico para médicos de atención primaria. Ediciones de la Universidad de Oviedo. 2006.
116. Tan, E. M., A. S. Cohen, J. F. Fries, A. T. Masi, D. J. McShane, N. F. Rothfield, J. G. Schaller, N. Talal, and R. J. Winchester. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277.
117. Hochberg, M. C. 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725.
118. Ferrari, P. 2003. Cortisol and the renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17:575-589.
119. Young, M. J., J. Morgan, K. Brodin, P. J. Fuller, and J. W. Funder. Activation of mineralocorticoid receptors by exogenous glucocorticoids and the development of cardiovascular inflammatory responses in adrenalectomized rats. *Endocrinology* 151:2622-2628.
120. Wilckens, T., and R. De Rijk. 1997. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today* 18:418-424.

121. van der Velden, V. H. 1998. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm* 7:229-237.
122. Herrada, A. A., C. Campino, C. A. Amador, L. F. Michea, C. E. Fardella, and A. M. Kalergis. Aldosterone as a modulator of immunity: implications in the organ damage. *J Hypertens* 29:1684-1692.
123. Suarez, A., P. Lopez, J. Gomez, and C. Gutierrez. 2006. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 65:1512-1517.
124. Lopez, P., J. Gomez, C. Prado, C. Gutierrez, and A. Suarez. 2008. Influence of functional interleukin 10/tumor necrosis factor-alpha polymorphisms on interferon-alpha, IL-10, and regulatory T cell population in patients with systemic lupus erythematosus receiving antimalarial treatment. *J Rheumatol* 35:1559-1566.
125. Chen, X., T. Murakami, J. J. Oppenheim, and O. M. Howard. 2004. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* 34:859-869.
126. Willenborg, D. O., S. Fordham, C. C. Bernard, W. B. Cowden, and I. A. Ramshaw. 1996. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 157:3223-3227.
127. Krakowski, M., and T. Owens. 1996. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 26:1641-1646.
128. Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein, and J. D. Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the

- critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
129. Richaud-Patin, Y., J. Alcocer-Varela, and L. Llorente. 1995. High levels of TH2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. *Rev Invest Clin* 47:267-272.
130. Horwitz, D. A., J. D. Gray, S. C. Behrendsen, M. Kubin, M. Rengaraju, K. Ohtsuka, and G. Trinchieri. 1998. Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type cytokines in patients with recent-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:838-844.
131. Nagy, G., E. Pallinger, P. Antal-Szalmas, M. Aleksza, M. Marschalko, M. Brozik, A. Falus, and P. Gergely. 2000. Measurement of intracellular interferon-gamma and interleukin-4 in whole blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 74:207-210.
132. Chan, R. W., F. M. Lai, E. K. Li, L. S. Tam, K. M. Chow, P. K. Li, and C. C. Szeto. 2006. Imbalance of Th1/Th2 transcription factors in patients with lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)* 45:951-957.
133. Tucci, M., L. Lombardi, H. B. Richards, F. Dammacco, and F. Silvestris. 2008. Overexpression of interleukin-12 and T helper 1 predominance in lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* 154:247-254.
134. Wong, C. K., C. Y. Ho, E. K. Li, and C. W. Lam. 2000. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 9:589-593.
135. Amerio, P., A. Frezzolini, D. Abeni, P. Teofoli, C. R. Girardelli, O. De Pita, and P. Puddu. 2002. Increased IL-18 in patients with systemic lupus erythematosus: relations with Th-1, Th-2, pro-inflammatory cytokines and disease activity. IL-18 is a marker of

- disease activity but does not correlate with pro-inflammatory cytokines. *Clin Exp Rheumatol* 20:535-538.
136. Zhang, Z., V. C. Kytтарыs, and G. C. Tsokos. 2009. The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis. *J Immunol* 183:3160-3169.
137. Jacob, N., H. Yang, L. Pricop, Y. Liu, X. Gao, S. G. Zheng, J. Wang, H. X. Gao, C. Putterman, M. N. Koss, W. Stohl, and C. O. Jacob. 2009. Accelerated pathological and clinical nephritis in systemic lupus erythematosus-prone New Zealand Mixed 2328 mice doubly deficient in TNF receptor 1 and TNF receptor 2 via a Th17-associated pathway. *J Immunol* 182:2532-2541.
138. Wong, C. K., L. C. Lit, L. S. Tam, E. K. Li, P. T. Wong, and C. W. Lam. 2008. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol* 127:385-393.
139. Chen, X. Q., Y. C. Yu, H. H. Deng, J. Z. Sun, Z. Dai, Y. W. Wu, and M. Yang. Plasma IL-17A is increased in new-onset SLE patients and associated with disease activity. *J Clin Immunol* 30:221-225.
140. Doreau, A., A. Belot, J. Bastid, B. Riche, M. C. Trescol-Biemont, B. Ranchin, N. Fabien, P. Cochat, C. Pouteil-Noble, P. Trolliet, I. Durieu, J. Tebib, B. Kassai, S. Ansieau, A. Puisieux, J. F. Eliaou, and N. Bonnefoy-Berard. 2009. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 10:778-785.
141. Mitsdoerffer, M., Y. Lee, A. Jager, H. J. Kim, T. Korn, J. K. Kolls, H. Cantor, E. Bettelli, and V. K. Kuchroo. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14292-14297.
142. Bacchetta, R., E. Gambineri, and M. G. Roncarolo. 2007. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 120:227-235; quiz 236-227.

143. Valencia, X., C. Yarboro, G. Illei, and P. E. Lipsky. 2007. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178:2579-2588.
144. Miyara, M., Z. Amoura, C. Parizot, C. Badoual, K. Dorgham, S. Trad, D. Nochy, P. Debre, J. C. Piette, and G. Gorochov. 2005. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175:8392-8400.
145. Crispin, J. C., A. Martinez, and J. Alcocer-Varela. 2003. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 21:273-276.
146. Alvarado-Sanchez, B., B. Hernandez-Castro, D. Portales-Perez, L. Baranda, E. Layseca-Espinosa, C. Abud-Mendoza, A. C. Cubillas-Tejeda, and R. Gonzalez-Amaro. 2006. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 27:110-118.
147. Gomez, J., A. Suarez, P. Lopez, L. Mozo, J. B. Diaz, and C. Gutierrez. 2006. Systemic lupus erythematosus in Asturias, Spain: clinical and serologic features. *Medicine (Baltimore)* 85:157-168.
148. Lopez, P., L. Mozo, C. Gutierrez, and A. Suarez. 2003. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus* 12:860-865.
149. Gerli, R., G. Nocentini, A. Alunno, E. B. Bocci, R. Bianchini, O. Bistoni, and C. Riccardi. 2009. Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 8:426-430.
150. Peters, J. H., F. W. Preijers, R. Woestenenk, L. B. Hilbrands, H. J. Koenen, and I. Joosten. 2008. Clinical grade Treg: GMP isolation, improvement of purity by CD127 Depletion, Treg expansion, and Treg cryopreservation. *PLoS One* 3:e3161.
151. Karagiannidis, C., M. Akdis, P. Holopainen, N. J. Woolley, G. Hense, B. Ruckert, P. Y. Mantel, G. Menz, C. A. Akdis, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3

- expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114:1425-1433.
152. Azab, N. A., I. H. Bassyouni, Y. Emad, G. A. Abd El-Wahab, G. Hamdy, and M. A. Mashahit. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin Immunol* 127:151-157.
153. Ling, Y., X. Cao, Z. Yu, and C. Ruan. 2007. Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol* 79:310-316.
154. Chung, I. Y., H. F. Dong, X. Zhang, N. M. Hassanein, O. M. Howard, J. J. Oppenheim, and X. Chen. 2004. Effects of IL-7 and dexamethasone: induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4+ cells. *Cell Immunol* 232:57-63.
155. Somerset, D. A., Y. Zheng, M. D. Kilby, D. M. Sansom, and M. T. Drayson. 2004. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 112:38-43.
156. Tai, P., J. Wang, H. Jin, X. Song, J. Yan, Y. Kang, L. Zhao, X. An, X. Du, X. Chen, S. Wang, G. Xia, and B. Wang. 2008. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol* 214:456-464.
157. Franchimont, D., J. Galon, M. S. Vacchio, S. Fan, R. Visconti, D. M. Frucht, V. Geenen, G. P. Chrousos, J. D. Ashwell, and J. J. O'Shea. 2002. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J Immunol* 168:2212-2218.
158. Pillai, V., and N. J. Karandikar. 2008. Attack on the clones? Human FOXP3 detection by PCH101, 236A/E7, 206D, and 259D reveals 259D as the outlier with lower sensitivity. *Blood* 111:463-464; author reply 464-466.

159. D.Q. Tran, H. Ramsey, E.M. Shevach. 2008 Anti-human FOXP3 mAb PCH101 stains activated human naive T cells non-specifically. *Blood* 111:464-466.
160. Polanczyk, M. J., B. D. Carson, S. Subramanian, M. Afentoulis, A. A. Vandembark, S. F. Ziegler, and H. Offner. 2004. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 173:2227-2230.
161. McKay, L. I., and J. A. Cidlowski. 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20:435-459.
162. Rogatsky, I., and L. B. Ivashkiv. 2006. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* 68:1-12.
163. Good, S. R., V. T. Thieu, A. N. Mathur, Q. Yu, G. L. Stritesky, N. Yeh, J. T. O'Malley, N. B. Perumal, and M. H. Kaplan. 2009. Temporal induction pattern of STAT4 target genes defines potential for Th1 lineage-specific programming. *J Immunol* 183:3839-3847.
164. Chen, Z., A. Laurence, Y. Kanno, M. Pacher-Zavisin, B. M. Zhu, C. Tato, A. Yoshimura, L. Hennighausen, and J. J. O'Shea. 2006. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8137-8142.
165. Dolff, S., D. Quandt, B. Wilde, T. Feldkamp, F. Hua, X. Cai, C. Specker, A. Kribben, C. G. Kallenberg, and O. Witzke. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 12:R150.
166. Henriques, A., L. Ines, M. Couto, S. Pedreiro, C. Santos, M. Magalhaes, P. Santos, I. Velada, A. Almeida, T. Carvalheiro, P. Laranjeira, J. M. Morgado, M. L. Pais, J. A. da Silva, and A. Paiva. Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Immunol* 264:97-103.

167. Mok, M. Y., H. J. Wu, Y. Lo, and C. S. Lau. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 37:2046-2052.
168. Yang, J., Y. Chu, X. Yang, D. Gao, L. Zhu, L. Wan, and M. Li. 2009. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 60:1472-1483.
169. Shah, K., W. W. Lee, S. H. Lee, S. H. Kim, S. W. Kang, J. Craft, and I. Kang. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 12:R53.
170. Clancy, R. M., P. J. Neufing, P. Zheng, M. O'Mahony, F. Nimmerjahn, T. P. Gordon, and J. P. Buyon. 2006. Impaired clearance of apoptotic cardiocytes is linked to anti-SSA/Ro and -SSB/La antibodies in the pathogenesis of congenital heart block. *J Clin Invest* 116:2413-2422.
171. Bombardieri, M., F. Barone, V. Pittoni, C. Alessandri, P. Conigliaro, M. C. Blades, R. Priori, I. B. McInnes, G. Valesini, and C. Pitzalis. 2004. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjogren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther* 6:R447-456.
172. Llorente, L., W. Zou, Y. Levy, Y. Richaud-Patin, J. Wijdenes, J. Alcocer-Varela, B. Morel-Fourrier, J. C. Brouet, D. Alarcon-Segovia, P. Galanaud, and D. Emilie. 1995. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 181:839-844.
173. Houssiau, F. A., C. Lefebvre, M. Vanden Berghe, M. Lambert, J. P. Devogelaer, and J. C. Renaud. 1995. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 4:393-395.

174. Harris, T. J., J. F. Grosso, H. R. Yen, H. Xin, M. Kortylewski, E. Albesiano, E. L. Hipkiss, D. Getnet, M. V. Goldberg, C. H. Maris, F. Housseau, H. Yu, D. M. Pardoll, and C. G. Drake. 2007. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 179:4313-4317.
175. Harada, T., V. Kytтарыs, Y. Li, Y. T. Juang, Y. Wang, and G. C. Tsokos. 2007. Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration. *Autoimmunity* 40:1-8.
176. Chun, H. Y., J. W. Chung, H. A. Kim, J. M. Yun, J. Y. Jeon, Y. M. Ye, S. H. Kim, H. S. Park, and C. H. Suh. 2007. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 27:461-466.
177. Linker-Israeli, M., R. J. Deans, D. J. Wallace, J. Prehn, T. Ozeri-Chen, and J. R. Klinenberg. 1991. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol* 147:117-123.
178. Peterson, E., A. D. Robertson, and W. Emlen. 1996. Serum and urinary interleukin-6 in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 5:571-575.
179. Nishimoto, N., K. Ito, and N. Takagi. Safety and efficacy profiles of tocilizumab monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis: meta-analysis of six initial trials and five long-term extensions. *Mod Rheumatol* 20:222-232.
180. Ito, H., M. Takazoe, Y. Fukuda, T. Hibi, K. Kusugami, A. Andoh, T. Matsumoto, T. Yamamura, J. Azuma, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Shimoyama, and T. Kishimoto. 2004. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126:989-996; discussion 947.

181. Illei, G. G., Y. Shirota, C. H. Yarboro, J. Daruwalla, E. Tackey, K. Takada, T. Fleisher, J. E. Balow, and P. E. Lipsky. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum* 62:542-552.
182. Dandona, P., A. Aljada, R. Garg, and P. Mohanty. 1999. Increase in plasma interleukin-10 following hydrocortisone injection. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1141-1144.
183. Gayo, A., L. Mozo, A. Suarez, A. Tunon, C. Lahoz, and C. Gutierrez. 1998. Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 85:122-130.
184. Nesbitt, J. E., and G. M. Fuller. 1992. Differential regulation of interleukin-6 receptor and gp130 gene expression in rat hepatocytes. *Mol Biol Cell* 3:103-112.
185. Zhang, Z., S. Jones, J. S. Hagood, N. L. Fuentes, and G. M. Fuller. 1997. STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* 272:30607-30610.
186. Unterberger, C., K. J. Staples, T. Smallie, L. Williams, B. Foxwell, A. Schaefer, B. Kempkes, T. P. Hofer, M. Koepfel, M. Lohrum, H. Stunnenberg, M. Frankenberger, and L. Ziegler-Heitbrock. 2008. Role of STAT3 in glucocorticoid-induced expression of the human IL-10 gene. *Mol Immunol* 45:3230-3237.
187. Mozo, L., A. Suarez, and C. Gutierrez. 2004. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy* 34:406-412.
188. Buckner, J. H., and S. F. Ziegler. 2004. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res Ther* 6:215-222.
189. Bonelli, M., K. von Dalwigk, A. Savitskaya, J. S. Smolen, and C. Scheinecker. 2008. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients

- with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis* 67:664-671.
190. Lin, S. C., K. H. Chen, C. H. Lin, C. C. Kuo, Q. D. Ling, and C. H. Chan. 2007. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest* 37:987-996.
191. Suen, J. L., H. T. Li, Y. J. Jong, B. L. Chiang, and J. H. Yen. 2009. Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* 127:196-205.
192. Zhang, B., X. Zhang, F. L. Tang, L. P. Zhu, Y. Liu, and P. E. Lipsky. 2008. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 67:1037-1040.
193. Beriou, G., C. M. Costantino, C. W. Ashley, L. Yang, V. K. Kuchroo, C. Baecher-Allan, and D. A. Hafler. 2009. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 113:4240-4249.
194. Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots, and I. Joosten. 2008. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112:2340-2352.
195. El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G. X. Zhang, B. N. Dittel, and A. Rostami. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12:568-575.
196. Zhang, L., H. Yi, X. P. Xia, and Y. Zhao. 2006. Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance. *Autoimmunity* 39:269-276.
197. Bonelli, M., A. Savitskaya, C. W. Steiner, E. Rath, J. S. Smolen, and C. Scheinecker. 2009. Phenotypic and functional analysis of CD4+

- CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 182:1689-1695.
198. Habib, H. M., T. E. Taher, D. A. Isenberg, and R. A. Mageed. 2009. Enhanced propensity of T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus to apoptosis in the presence of tumour necrosis factor alpha. *Scand J Rheumatol* 38:112-120.
199. Wang, H., J. Xu, X. Ji, X. Yang, K. Sun, X. Liu, and Y. Shen. 2005. The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol* 235:117-121.
200. Yang, H. X., W. Zhang, L. D. Zhao, Y. Li, F. C. Zhang, F. L. Tang, W. He, and X. Zhang. 2009. Are CD4+CD25-Foxp3+ cells in untreated new-onset lupus patients regulatory T cells? *Arthritis Res Ther* 11:R153.
201. Dominitzki, S., M. C. Fantini, C. Neufert, A. Nikolaev, P. R. Galle, J. Scheller, G. Monteleone, S. Rose-John, M. F. Neurath, and C. Becker. 2007. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol* 179:2041-2045.
202. Zheng, S. G., J. Wang, and D. A. Horwitz. 2008. Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol* 180:7112-7116.
203. Xu, L., A. Kitani, I. Fuss, and W. Strober. 2007. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178:6725-6729.
204. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.

205. Long, S. A., and J. H. Buckner. 2008. Combination of rapamycin and IL-2 increases de novo induction of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T cells. *J Autoimmun* 30:293-302.
206. Hippen, K. L., S. C. Merkel, D. K. Schirm, C. Nelson, N. C. Tennis, J. L. Riley, C. H. June, J. S. Miller, J. E. Wagner, and B. R. Blazar. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am J Transplant* 11:1148-1157.
207. Golovina, T. N., T. Mikheeva, T. M. Brusko, B. R. Blazar, J. A. Bluestone, and J. L. Riley. Retinoic acid and rapamycin differentially affect and synergistically promote the ex vivo expansion of natural human T regulatory cells. *PLoS One* 6:e15868.
208. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299:1033-1036.
209. O'Sullivan, B. J., H. E. Thomas, S. Pai, P. Santamaria, Y. Iwakura, R. J. Steptoe, T. W. Kay, and R. Thomas. 2006. IL-1 beta breaks tolerance through expansion of CD25+ effector T cells. *J Immunol* 176:7278-7287.
210. Nadkarni, S., C. Mauri, and M. R. Ehrenstein. 2007. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med* 204:33-39.
211. Zelenay, S., T. Lopes-Carvalho, I. Caramalho, M. F. Moraes-Fontes, M. Rebelo, and J. Demengeot. 2005. Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4091-4096.
212. Yan, B., and Y. Liu. 2009. The Nature of Increased Circulating CD4CD25Foxp3 T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Novel Hypothesis. *Open Rheumatol J* 3:22-24.

213. Herrada, A. A., F. J. Contreras, N. P. Marini, C. A. Amador, P. A. Gonzalez, C. M. Cortes, C. A. Riedel, C. A. Carvajal, F. Figueroa, L. F. Michea, C. E. Fardella, and A. M. Kalergis. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol* 184:191-202.
214. Dalbeth, N., J. Edwards, S. Fairchild, M. Callan, and F. C. Hall. 2005. The non-thiol angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril suppresses inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44:24-31.
215. Sagawa, K., K. Nagatani, Y. Komagata, and K. Yamamoto. 2005. Angiotensin receptor blockers suppress antigen-specific T cell responses and ameliorate collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 52:1920-1928.
216. Platten, M., S. Youssef, E. M. Hur, P. P. Ho, M. H. Han, T. V. Lanz, L. K. Phillips, M. J. Goldstein, R. Bhat, C. S. Raine, R. A. Sobel, and L. Steinman. 2009. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14948-14953.
217. Weber, J., V. Tiriveedhi, M. Takenaka, W. Lu, R. Hachem, E. Trulock, G. A. Patterson, and T. Mohanakumar. Inhibition of renin angiotensin aldosterone system causes abrogation of obliterative airways disease through inhibition of tumor necrosis factor-alpha-dependant interleukin-17. *J Heart Lung Transplant*.
218. Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis, and A. G. Betz. 2005. Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med (Berl)* 83:88-96.
219. Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis, and A. G. Betz. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5:266-271.
220. Lee, J. H., B. Ulrich, J. Cho, J. Park, and C. H. Kim. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T

regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. *J Immunol* 187:1778-1787.

221. Frey, F. J., A. Odermatt, and B. M. Frey. 2004. Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13:451-458.

RESUMEN

RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que puede presentar una gran variedad de características clínicas e inmunológicas y en la cual las células T efectoras y reguladoras juegan un papel clave.

Se han creado muchas expectativas en el uso de la transferencia adoptiva de células Treg para el tratamiento de muchos desórdenes inmunes, lo que ha hecho necesario el desarrollo de protocolos para generar o expandir esta población *in vivo* o *in vitro*. Dado que los glucocorticoides han demostrado ser capaces de incrementar la expresión de FOXP3, podrían ser incluidos en estos protocolos. Los resultados derivados de esta tesis doctoral muestran que la dexametasona incrementa significativamente la expresión de FOXP3 y genera células CD25^{high} anérgicas con características fenotípicas de las células Treg naturales, pero incapaces de inhibir significativamente la proliferación celular. De igual forma, aunque la dexametasona fue capaz de incrementar la expresión de FOXP3 en células Treg generadas *in vitro* con TGFβ, de nuevo este efecto no se correlacionó con un incremento en la actividad supresora. El hecho de que las células CD4⁺CD25^{high} procedentes de pacientes de LES tratados con prednisona no muestren una capacidad antiproliferativa significativamente mayor que las de los pacientes bajo otros tratamientos parece avalar los resultados obtenidos *in vitro*. Tomados en conjunto, estos datos apoyan la idea de que en humanos la expresión de FOXP3 no es un atributo exclusivo de las células Treg, por lo que el uso de FOXP3 como marcador de esta población debe ser realizado con cautela, especialmente en pacientes con enfermedades inflamatorias o aquellos que se encuentran bajo tratamiento con corticoides.

El estudio de las células T CD4⁺ efectoras en pacientes de LES e individuos sanos mostró que el aumento de la población Th17

observado en pacientes está relacionado con el uso de dosis intermedias/altas de glucocorticoides. En estos pacientes se encontró una correlación positiva entre el ratio Th17/Th1 y el índice SLEDAI. Aunque no se halló ninguna asociación con las manifestaciones clínicas, resultó interesante el incremento en la población Th17 mostrado por los pacientes con anticuerpos anti-ENA, que sugiere la posibilidad de utilizar estos autoanticuerpos como biomarcadores de la tendencia a desarrollar una respuesta Th17 excesiva, fundamentalmente en pacientes susceptibles de ser tratados con glucocorticoides. El análisis de la expresión génica de IL-6R, IL-12R, STAT3 y STAT4 sugiere que el efecto de los glucocorticoides sobre el balance Th17/Th1 está mediado por su capacidad para incrementar la expresión de IL-6R y STAT3.

Por último, el análisis de las diferentes subpoblaciones de células FOXP3⁺ en el LES mostró un aumento de las células que expresaban este factor de transcripción dentro de las poblaciones CD25⁻ y CD25^{low}. La proporción de células CD25⁻FOXP3⁺ en pacientes se encontró asociada con la evolución de la enfermedad y el descenso de los linfocitos T CD4⁺, mientras que el incremento de la población CD25^{low}FOXP3⁺ parece estar relacionado con activación celular. Nuestros resultados sugieren que estas dos poblaciones carecen de actividad supresora, lo que nos induce a postular la hipótesis de que las células FOXP3⁺CD25⁻ constituyen una población de células anérgicas – estado asociado a la expresión de FOXP3⁻ que podrían originarse como mecanismo de autocontrol de la inflamación o como consecuencia del tratamiento con corticoides. Por otra parte, aunque el porcentaje de células Treg clásicas, CD25^{high}FOXP3⁺, fue similar en pacientes y en controles, su actividad funcional parece estar alterada en el LES, ya que no se correlacionan negativamente con las células efectoras Th productoras de citocinas como ocurre en controles. Además, las células CD25^{high} de pacientes activos tienden a producir más IL-17, estando el balance IL-17⁺/FOXP3⁺ significativamente aumentado en esta

población. Estos hallazgos, junto con el hecho de que los niveles séricos de IL-17 se correlacionan con el número de células CD25^{high}FOXP3⁺ en pacientes, sugiere que las células Treg de los pacientes de LES tienden a trans-diferenciarse en células Th17.

SUMMARY

SUMMARY

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder characterized by a broad clinical spectrum in which both effector and regulatory CD4⁺ T lymphocytes play key roles.

Treg adoptive transfer therapy has become an attractive way to treat a broad array of immunological disorders. Thus it is of great importance to provide new protocols for generating or expanding these populations *in vitro* or *in vivo*. Since it is known that glucocorticoids enhance FOXP3 expression, they could be included in these protocols. Results from the present thesis reveal that dexamethasone upregulates FOXP3 expression and generates anergic CD25^{high} cells with phenotypic characteristics comparable to those of nTreg cells but unable to significantly inhibit cellular proliferation. As well, dexamethasone treatment increases FOXP3 levels in Treg cells generated *in vitro* with TGFβ, but again, this expression does not correlate with increased suppressor ability. These results are supported by the fact that CD4⁺CD25^{high} cells from SLE patients under prednisone therapy do not exhibit enhanced suppressive function than those from SLE patients not receiving this treatment.

Taking together, our data support the idea that FOXP3 expression in humans is not an exclusive attribute of Treg cells. Subsequently, the use of FOXP3 as a Treg cell marker must be done cautiously, especially in patients with systemic inflammatory diseases or those under corticoid treatment.

The study of effector CD4⁺ T in SLE patients and healthy controls demonstrates a relevant effect of high/intermediate doses of glucocorticoids on the deviation towards a Th17 response observed in lupus patients. SLEDAI score correlates positively with Th17/Th1 ratio in corticoid treated patients but not in other patient groups.

Although the analysis of clinical characteristics of SLE patients did not reveal significant differences in Th17 cells or Th17/Th1 index, presence of autoantibodies against ENA seemed to be associated with Th17 responses, suggesting that anti-ENA positivity could be used as a potential biomarker for Th17 bias, especially in those patients which can be treated with glucocorticoids.

The analysis of IL-6R, IL-12R, STAT3 and STAT4 gene expression suggested that the effect of glucocorticoids on Th17/Th1 index is mediated by their capacity to increase STAT3 and IL-6R expression.

Finally, the analysis of FOXP3⁺ populations in SLE patients showed an increment in CD25⁺FOXP3⁺ population in SLE associated with CD4⁺ downregulation and disease progression, whereas the increased percentages of CD25^{low} FOXP3⁺ cells seem to be related to the activated status of SLE lymphocytes. Our results suggest that these FOXP3⁺ populations do not display regulatory functions. In view of this data and taking into consideration that FOXP3 expression has been associated with anergy in non-suppressive cells, we hypothesize that CD25⁺FOXP3⁺ is a population of anergic cells that could arise after inflammation or as response to corticoid treatment. Besides, in spite of the normal amount of CD25^{high}FOXP3⁺ cells (classical Treg cells), the data herein presented evidence on the impairment of Treg function in SLE, since the negative correlations between the number of Treg and Th secreting cells found in healthy subjects were disrupted in patients. Also, our data showed that CD25^{high} cells from active patients tend to secrete more IL-17 and, importantly, present a greatly decreased FOXP3⁺/IL-17⁺ ratio as compared to healthy individuals. These data, together with the positive correlation found between the number of CD25^{high}FOXP3⁺ cells and serum levels of IL-17 in lupus patients, seem to suggest that Treg from SLE patients tend to trans-differentiate into Th17 cells.

ANEXO I



Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity

Catuxa Prado^a, Jesús Gómez^b, Patricia López^a, Banesa de Paz^a, Carmen Gutiérrez^{a,b}, Ana Suárez^{a,*}

^a Department of Functional Biology, Immunology Area, Faculty of Medicine, University of Oviedo, C/Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain

^b Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, C/Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2009

Received in revised form 30 June 2010

Accepted 30 June 2010

Keywords:

Anergy
Corticoids
FOXP3
Regulatory T cells
Systemic lupus erythematosus

ABSTRACT

Recent studies have shown the capacity of corticoids to increase forkhead box p3 (FOXP3) expression, which suggests that these drugs may be able to generate regulatory T cells (Treg). Therefore, corticoids may possibly be employed in protocols to generate or expand Treg cells with the aim of being used in cell transfer therapy. However, given that in humans FOXP3 is not necessarily associated with regulatory function, it is of great importance to ascertain whether FOXP3-expressing cells generated with corticoids are “truly” Treg cells. To this end, we studied the effect of dexamethasone on both human activated lymphocytes and *in vitro* generated Treg cells as well as regulatory activity of CD4⁺CD25^{high} cells from SLE patients users and non users of prednisone. Results show that dexamethasone markedly enhances FOXP3 expression and generates CD25^{high} cells with phenotypic characteristics attributable to natural Treg cells. Unexpectedly, in spite of their hyporesponsiveness and enhanced FOXP3 expression, these cells did not exert suppressive activity. Moreover, although dexamethasone was able to enhance FOXP3 expression in *in vitro* generated Treg cells, once again this effect was not correlated with increased regulatory activity. These results were supported by the fact that CD4⁺CD25^{high} cells from steroid-treated SLE patients did not show a higher antiproliferative function than those from non-steroid-treated patients. We conclude that the increment on FOXP3 expression caused by dexamethasone is not connected with regulatory function, supporting the fact that FOXP3 expression in humans is not an exclusive attribute of Treg cells. Subsequently, the use of FOXP3 as a Treg cell marker must be done cautiously, especially in patients with systemic inflammatory diseases or those under corticoid treatment.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Several lines of evidence have shown the role of regulatory cells in human diseases since they are potent suppressors and can prevent adverse immune responses (Sakaguchi et al. 1995; Bacchetta et al. 2007). As a result, Treg cells have become attractive targets for the treatment of a broad array of immunological disorders. In fact, the use of Treg transfer therapy, although difficult, is expected to be an efficacious way to treat some human diseases, such as autoimmune disorders or organ rejection. Thus it is of great importance to provide new protocols for generating or expanding these populations *in vitro* or *in vivo*.

A variety of regulatory CD4⁺ T cells have been described, including adaptative regulatory T cells (Tr1 and Th3), generated in the

periphery, and naturally occurring regulatory T cells (nTreg), a population derived from the thymus and characterized by the constitutive expression of the IL-2 receptor α chain (CD25) and the transcription factor FOXP3. Among them, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells have constituted the most widely studied population, as it is known that the reduced number or function of this subset could lead to autoimmune disorders, allergies and organ rejection, thus suggesting their potential therapeutic use (Bacchetta et al. 2007). Nonetheless, the distinction between natural and induced regulatory T cells does not seem to be very accurate. In fact, convincing evidence suggests that it is possible to generate CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells phenotypically similar to nTreg in the periphery and in *in vitro* cultures (Buckner & Ziegler 2004; Pillai et al. 2007). In this respect, it has been demonstrated that TGF β is capable, in conjunction with TCR stimulation, of increasing FOXP3 expression and of generating functional Treg cells *in vitro* from human and mouse CD25⁻FOXP3⁻ lymphocytes (Chen et al. 2003; Rao et al. 2005).

It has been demonstrated that FOXP3 expression is related to the development of Treg cells in the thymus (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). In fact, this transcription factor is expressed in mice by nTreg cells and its expression is necessary and sufficient

Abbreviations: Treg, regulatory T cells; nTreg, natural regulatory T cells; FOXP3, forkhead box protein 3; SLE, systemic lupus erythematosus; pb, plate bound; Dex, dexamethasone; MDDC, monocyte derived dendritic cells.

* Corresponding author. Tel.: +34 985102789; fax: +34 985103534.

E-mail address: anasua@uniovi.es (A. Suárez).

to generate cells with suppressive properties (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Ziegler 2006). As a result, FOXP3 has been used as a specific marker of Treg cells. However, although FOXP3 is also expressed in human nTreg cells, some reports have suggested that it is not necessarily associated with regulatory functions (Gavin et al. 2006; Morgan et al. 2005; Ziegler 2006). In fact, there are a number of essential differences between human and murine FOXP3. For instance, TCR stimulation of human T lymphocytes triggers FOXP3 expression (Abraham et al. 2008; Walker et al. 2003; Wang et al. 2007), whereas murine lymphocytes do not (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). Moreover, contradictory results regarding the suppressive capacity of human activated CD25⁺FOXP3⁺ cells have been published (Abraham et al. 2008; Allan et al. 2005, 2007; Mahic et al. 2008; Verhasselt et al. 2004; Walker et al. 2003, 2005; Wang et al. 2007).

It is known that glucocorticoids, commonly used to treat a variety of inflammatory and autoimmune diseases, exert a broad range of effects on the immune system, most of which are related to their capacity to inhibit cytokine production and other inflammatory mediators. However, recent evidence has shown that steroid drugs could also influence the regulatory cell population or even generate Treg cells. For instance, treatment with glucocorticoids leads to an increase in Treg cells and FOXP3 levels in asthma (Karagiannidis et al. 2004), systemic lupus erythematosus (SLE) (Azab et al. 2008; Lopez et al. 2008; Suarez et al. 2006; Zhang et al. 2008) and immune thrombocytopenia purpura patients (Ling et al. 2007). Moreover, it has been reported that dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, enhances CD25 (Chung et al. 2004) and FOXP3 (Karagiannidis et al. 2004) expression *in vitro* in human T lymphocytes. In murine models, intraperitoneal injection of this glucocorticoid increases the proportion of CD4⁺CD25⁺ cells in lymph nodes (Chen et al. 2006). Furthermore, the observed increase in the percentage of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells during pregnancy has been related to high serum estrogen concentration (Somerset et al. 2004), given that *in vitro* treatment of murine CD4⁺CD25⁻ cells with estrogens triggers CD25 and FOXP3 expressions (Tai et al. 2008). However, the mechanisms via which glucocorticoids exert these effects are not demonstrated and could be the result of expansion of pre-existing CD25⁺FOXP3⁺ cells, *de novo* generation of CD25⁺FOXP3⁺ from CD25⁻FOXP3⁻ cells or as a result of inducing selective cell death in CD25⁻FOXP3⁻ cells (Chen et al. 2004).

The aim of the current study was two-fold: first, to ascertain whether dexamethasone was capable of enhancing FOXP3 expression in both activated T cells and Treg cells generated *in vitro* with TGFβ; and second, to determine phenotypic and functional features of dexamethasone-induced FOXP3-expressing cells.

Materials and methods

Cell isolation

PBMC were separated from healthy blood donor buffy coats (Blood Transfusion Centre, Oviedo, Spain) by centrifugation over Ficoll-Isopaque (Lymphoprep™). To isolate CD4⁺CD25⁻ cells, CD4⁺ T cells were first purified by negative selection using the Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kit (EasySep, StemCell Technologies Inc.), and then depleted of CD25⁺ cells using the Human CD25⁺ Positive Selection Kit (EasySep), obtaining a purity higher than 99%. CD4⁺CD25^{high} (nTreg) cells from controls and SLE patients and CD4⁺CD25⁻ cells from patients were separated by using the CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Germany) following manufacturer's instructions. To generate monocyte derived dendritic cells (MDDC) monocytes were positively isolated from PBMC from a healthy blood donor by using anti-CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec).

Independent experiments were performed with cells from different individuals. All blood donors (the number is specified in each figure legend) were healthy adult volunteers between 18 and 60 years old (mean age 43.3 ± 12.04 years) without any pathology or treatment. Approval for this study was obtained from the Regional Ethics Committee for Clinical Investigation.

Cell activation and culture conditions

CD4⁺CD25⁻ T cells were cultured at 10⁶ cells/ml and stimulated with plate bound (pb) anti-CD3 (eBioscience, clon OKT3) (5 μg/ml) and pb anti-CD28 (AbD Serotec, clon YTH913.1) (2.5 μg/ml) mAb in the presence or absence of 10⁻⁷ M of dexamethasone (Sigma, Germany) during 24 h. These culture conditions were determined after trying different dose (10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ and 10⁻⁶ M) and time (12, 24 and 48 h) conditions. We noticed that longer times or concentrations of dexamethasone caused marked cell death and the remaining viable cells proliferated poorly, whereas lower concentrations or times seemed to have little effect on T cell differentiation. After dexamethasone treatment, cells were washed and expanded for 2 weeks with pb anti-CD3/CD28 plus 100 U/ml of recombinant human IL-2 (R&D Systems, Europe). Cells were washed and restimulated after the first week of culture. To generate Treg cells, cultures were performed in an identical manner, but 10 ng/ml of TGFβ1 (R&D Systems) were added to the cultures and maintained throughout the assays. To generate MDDC, monocytes were cultured for 7 days with 70 ng/ml of GM-CSF and 35 ng/ml of IL-4 (R&D Systems) and then matured for 2 days with TNFα (50 ng/ml, R&D Systems). All cultures were performed in RPMI 1640 medium with 25 mM Hepes and L-glutamine (BioWhittaker) supplemented with 10% of heat-inactivated FCS (HyClone Logan, USA), 20 U/ml of penicillin and 20 μg/ml of streptomycin at 37 °C and 5% CO₂.

Flow cytometry analysis and monoclonal antibodies

Phenotypic characteristics of cells were assessed by flow cytometry. To this end, cells were stained with the following mAb: PE-CD25, PE-CD45RO, FITC-CD69 and FITC-CD25 from Miltenyi Biotec; FITC-CD127 and PE-PCH101 FOXP3 from eBioscience; FITC-GITR from R&D Systems; PerCP-CD4, PE-CD152 (CTLA4), PE-259D/C7 FOXP3 and fluorochrome-matched isotypic controls from Becton Dickinson (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). For intracellular staining, cells were first extracellularly labelled and then fixed, permeabilized and intracellularly stained with CTLA4 (Fix and Perm, Caltag) or FOXP3 PCH101 clone or 259D clone (following each manufacturer's instructions). Flow cytometric data was acquired and analyzed on a FACScan cytometer using the CellQuest Pro software (BD).

FOXP3 mRNA quantification

FOXP3 mRNA levels were quantified by real time RT-PCR. To this end, mRNA was isolated using the mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche Diagnostics, Germany), following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was carried out using Reverse-iT™ RTase Blend (ABgene, UK), according to the standard procedure. cDNA was amplified using FastStar DNA Master SYBR Green I (Roche), in a real time thermocycler (Light Cycler, Roche). β-Actin was used as housekeeping gene. Quantification of FOXP3 and β-actin was performed using an external standard, as previously reported (Lopez et al. 2008). Primer sequences were as follows: 5'-GAAACAGCACTATCCCAGAGTTC-3' and 5'-ATGGCCAGCGGATGAG-3' for FOXP3; 5'-GGTCTCAA-

CATGATCTGGG-3' and 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3' for β -actin.

Proliferation and suppression assays

Proliferative response of CD25⁺-generated cells was determined by culturing them with irradiated (3000 cGy) autologous PBMC and PHA (2 μ g/ml). Cultures were pulsed with ³H-thymidine (1 μ Ci/well) on day 4 and proliferation was assessed 18 h later using a liquid scintillation counter. To determine suppressive function of nTreg cells from SLE patients, 5.0×10^4 CD4⁺CD25⁻ cells were stimulated with allogenic MDDC and cultured alone or with 2.5×10^4 autologous CD4⁺CD25^{high} cells (ratio 2:1). CFSE assay was preferred in experiments to test the suppressor activity of CD25⁺-generated cells since, *a priori*, it cannot be assured that these cells do not proliferate upon mitogenic stimulation, thus data obtained by CFSE assay allowed the detection of suppression which could be underestimated using the traditional ³H-thymidine assay. To this end, 5.0×10^4 PBMC (effector cells) activated with 2 μ g/ml PHA were cultured with 5.0×10^4 (ratio 1:1), 2.5×10^4 (ratio 2:1) or 1.25×10^4 (ratio 4:1) of each kind of autologous CD25⁺-generated cells. Prior to stimulation, effector cells were labeled with 2.5 μ M CFSE (Sigma) for 10 min at 37 °C. On day 4 cells were harvested and washed, and the CFSE dye dilution was analyzed by flow cytometry. All assays were conducted in triplicate.

SLE patients

Eleven inactive SLE patients (SLEDAI \leq 10; median: 4) that fulfilled the American College of Rheumatology criteria for SLE were selected from the Asturian Register of SLE (Gomez et al. 2006; Lopez et al. 2003) (age, mean \pm SD: 48.0 \pm 10.1 years; disease duration: 9.4 \pm 5.0 years) and classified according to their treatment in the previous 6 months. Six patients were receiving antimalarial drugs and five were under antimalarial and glucocorticoid therapies (prednisone dose, mean \pm SD: 8.0 \pm 2.1 mg/day). Signed informed consent was always obtained from healthy blood donors and SLE patients prior to participation in the study.

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SD. Independent experiments were performed with different donors. A paired *t* test was used to evaluate differences between mean values due to the dexamethasone treatment. To assess differences between inhibitive capacity of CD4⁺CD25^{high} cells from SLE patients, a Student *t* test was applied. In the experiments in which cell suppressive capacity was tested using CFSE, percentage of inhibition was calculated as: $100 - [(\% \text{ cells divided in the coculture} - \% \text{ cells divided in the negative control}) / (\% \text{ cells divided in the positive control} - \% \text{ cells divided in the negative control}) \times 100]$. Negative control: unstimulated effector cells; positive control: PHA-stimulated effector cells. All data were verified for normal distribution. Statistical analyses were performed using the SPSS 15.0 statistical software package (SPSS Inc.).

Results

Expression of FOXP3 and Treg markers on stimulated CD4⁺CD25⁻ cells treated with dexamethasone

Highly purified CD4⁺CD25⁻ T cells (purity > 99%, Fig. 1a, left panel) were plated at 10^6 cells/ml and stimulated with pb anti-CD3 and pb anti-CD28 mAb in the presence or absence of dexamethasone for 24 h. As shown in Fig. 1a, at that time, dexamethasone treatment inhibited the expression of the activation markers CD25 and CD69 and prevented the downregulation of CD127, as was

previously reported (Franchimont et al. 2002), however it did not increase the number of FOXP3⁺ cells but slightly decreased. After this pretreatment, cells were washed and the culture was continued with anti-CD3/CD28 and exogenous IL-2 (100 U/ml). Six days later cells were recovered and plated at 10^6 cells/ml, restimulated and cultured for an additional week. Throughout the 14 days of culture cells were counted at different time points (Fig. 1b), obtaining in both conditions a comparable level of expansion (4.0 ± 1.1 vs 5.2 ± 0.8 ; $n = 3$).

On day 14, cells were analyzed by flow cytometry (Fig. 1c). At that time, most of the cells expressed CD25, however, at the single cell level (MFI values), dexamethasone-treated cells (CD25⁺-Dex) showed a slightly higher expression of CD25 than cells without dexamethasone-treatment (CD25⁺-Control) (1864.1 ± 497.5 vs 1452.1 ± 521.9 ; $n = 10$; n.s.). Nevertheless, the most notable effect of dexamethasone was the increase in FOXP3 expression per cell (MFI, 59.9 ± 29.5 vs 29.4 ± 10.6 ; $n = 10$; $p < 0.05$) and in the percentage of positive FOXP3 cells ($60.1 \pm 21.1\%$ vs $32.6 \pm 12.8\%$; $n = 10$; $p < 0.001$). Flow cytometric analysis of other activation and differentiation markers (Fig. 1d) showed that CD25⁺-Control cells presented higher percentages of CD69⁺ lymphocytes ($58.3 \pm 19.0\%$ vs $36.6 \pm 16.3\%$; $n = 10$; $p < 0.05$) and higher CD69 expression per cell (MFI, 130.5 ± 65.2 vs 59.1 ± 39.7 ; $n = 10$; $p < 0.05$) than CD25⁺-Dex cells, suggesting an activated status. Moreover, CD25⁺-Dex cells expressed lower levels of CD4 (MFI, 85.9 ± 42.5 vs 106.4 ± 41.3 ; $n = 10$; n.s.) and higher levels of iCTLA4 (MFI, 125.4 ± 42.4 vs 83.3 ± 21.9 ; $n = 4$; n.s.) than CD25⁺-Control cells, thus supporting their Treg phenotype. As regards CD127 expression, we did not find any differences between CD25⁺-Control and CD25⁺-Dex cells. These results suggest that CD25⁺-Dex cells display a phenotype comparable to that attributed to nTreg cells (CD4^{low}CD25^{high}CD69^{low}GITR⁺CD45RO⁺CD127^{-/low}iCTLA4⁺FOXP3⁺).

Dexamethasone upregulates FOXP3 expression in Treg cells generated *in vitro* with TGF β

We next wished to assess the effect of dexamethasone on FOXP3 expression in *in vitro* generated Treg cells. To this end, purified CD4⁺CD25⁻ cells were stimulated with pb anti-CD3/CD28 plus IL-2 in the presence of TGF β for 14 days with or without an initial priming with dexamethasone during the first 24 h, thus obtaining TGF β -Dex Treg or TGF β Treg cells, respectively. FOXP3 and CD25 expression was analysed by flow cytometry in both cell types as well as in freshly isolated CD4⁺CD25^{high} (nTreg) cells. Fig. 2 shows that *in vitro* generated TGF β Treg cells presented similar levels of FOXP3 expression to freshly isolated nTreg cells. However, dexamethasone pretreatment was able to increase the number of FOXP3⁺ cells ($77.5 \pm 9.4\%$ vs $61.4 \pm 5.8\%$; $n = 5$; $p < 0.05$) and the MFI values (124.1 ± 18.0 vs 90.9 ± 20.3 ; $n = 5$; $p = 0.05$) compared to non-dexamethasone treated cells. Since the specificity and sensitivity of some anti-FOXP3 mAb have been questioned (Pillai and Karandikar 2008), the effect of dexamethasone on FOXP3 expression was confirmed by using another anti-FOXP3 mAb (clone 259D/C7; BD), obtaining the same effect (data not shown).

Effect of dexamethasone on FOXP3 mRNA expression

Next, we wanted to corroborate the upregulatory effect of dexamethasone on FOXP3 by gene expression analysis. To this end, mRNA was isolated from CD25⁻ starting population and at different time points during the CD25⁺-Control, CD25⁺-Dex, TGF β Treg and TGF β -Dex Treg differentiation and FOXP3 gene expression was quantified by real time RT-PCR (Fig. 3). Messenger RNA from freshly isolated CD4⁺CD25^{high} T cells was used as positive Treg control. Results showed that, after the first 24 h of culture, dexamethasone treatment upregulated the amount of FOXP3 transcripts at

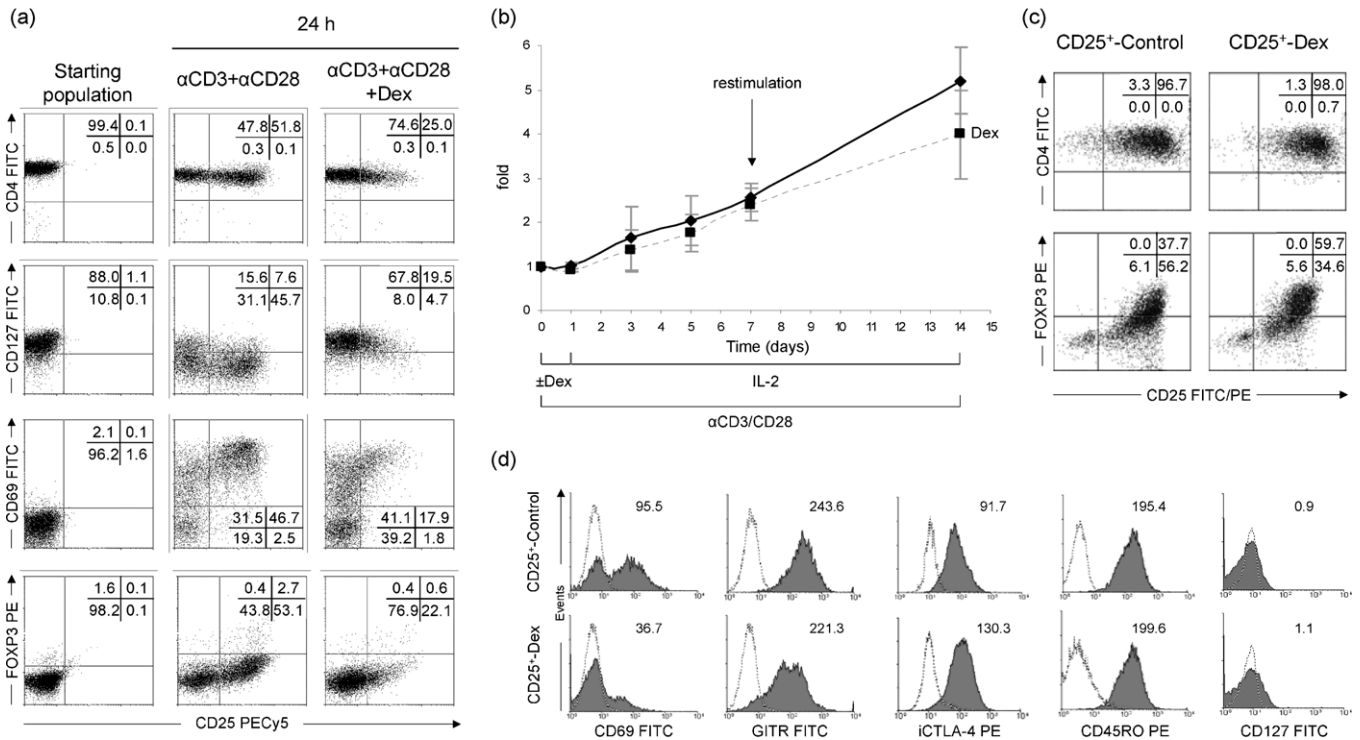


Fig. 1. Effect of dexamethasone treatment on CD4⁺CD25⁻ stimulated cells. (a) Expression of CD4, CD25, CD127, CD69 and FOXP3 in CD4⁺CD25⁻ cells before (starting population) and after 24 h of treatment with pb anti-CD3/CD28 in the presence or absence of 10⁻⁷ M of dexamethasone. Dot plots show the results of a representative experiment (n = 3). (b) Cellular expansion of freshly isolated CD4⁺CD25⁻ cells (10⁶ cells/ml) stimulated with anti-CD3/CD28 and IL-2 during 14 days with (dashed line) or without (solid line) 24 h of dexamethasone pre-treatment. On day 7 cells were restored at 10⁶ cells/ml and restimulated. Both cell cultures were counted at indicated time points. The expansion curve represents mean ± SD of 3 independent experiments. (c) CD25 and FOXP3 expression of cells obtained after 14 days of expansion with or without an initial 24h-Dex treatment (CD25⁺-Dex and CD25⁺-Control). After the *in vitro* expansion period, cells were stained intra- and extracellularly and analysed by flow cytometry. Numbers in the plots indicate the percentage of cells in each quadrant. (d) Expression of activation and Treg markers in CD25⁺-Dex and CD25⁺-Control cells after 14 days of culture. Numbers represent MFI values. The results of one representative experiment are shown (n = 10). Each individual experiment was performed with a different donor. FOXP3: forkhead box protein 3 (intracellular staining); GITR, glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor; iCTLA4, cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (intracellular staining).

all time points and conditions tested. The highest levels of FOXP3 mRNA expression were observed in TGFβ-Dex Treg cells, in line with the amount of protein obtained after 14 days of culture (Fig. 1c and Fig. 2).

Suppressive function of dexamethasone-treated cells

To assess the functional activity of dexamethasone-treated cells we determined their ability to suppress cellular proliferation. Thus, previously cryopreserved autologous PBMC (effector cells) were

labeled with CFSE, stimulated with PHA and cultured alone, with purified autologous CD4⁺CD25^{high} cells (as positive control for suppression) or in the presence of CD25⁺-Control, CD25⁺-Dex, TGFβ Treg, TGFβ-Dex Treg cells at different effector:CD25⁺ cell ratios (4:1, 2:1 and 1:1). As shown in Fig. 4a, CD25⁺-Control and CD25⁺-Dex cells achieved a slight but not relevant inhibitory effect over effector cell division compared to nTreg cells. Conversely, TGFβ Treg and TGFβ-Dex Treg cells were able to suppress proliferation in a dose dependent manner. Similar results were obtained when suppressor activity was assessed by ³H-thymidine incorporation (data

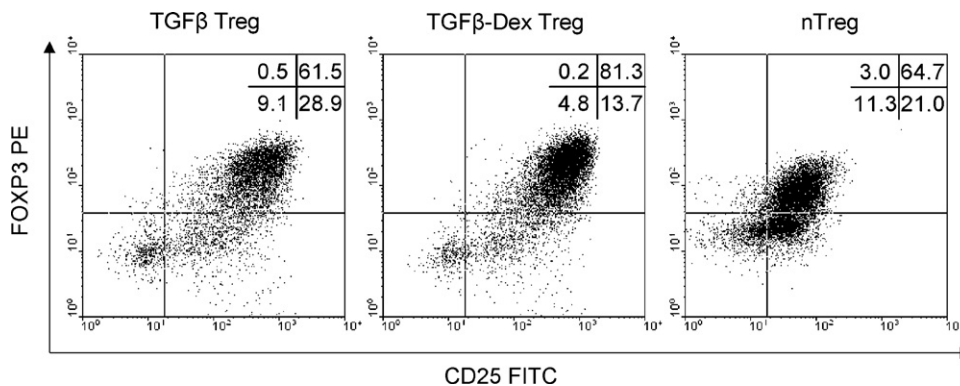


Fig. 2. FOXP3 expression for nTreg and Treg cells generated *in vitro* with TGFβ. CD4⁺CD25⁻ lymphocytes were cultured with anti-CD3/CD28, IL-2 and TGFβ for 2 weeks in the presence (TGFβ-Dex Treg) or absence (TGFβ Treg) of dexamethasone during the first 24 h. CD4⁺CD25^{high} cells (nTreg) were isolated from healthy donors. All Treg cells were labelled with CD25 FITC and FOXP3 PE (clone PCH101). Numbers at the top of the plots indicate the percentage of events in each quadrant. The result of a representative experiment is shown (n = 5).

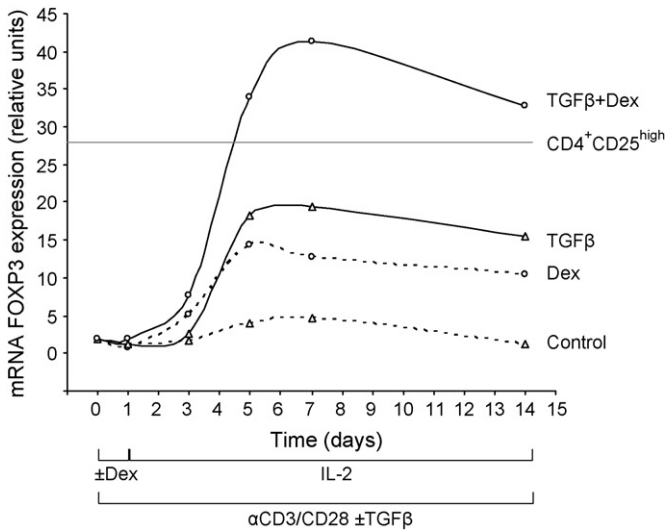


Fig. 3. Dexamethasone increments FOXP3 mRNA expression. CD4⁺CD25⁻ cells were treated with anti-CD3/CD28 and IL-2, in the presence or absence of TGFβ and dexamethasone, as explained in section ‘Methods’. At the indicated times (0, 1, 3, 5, 7 and 14 days) cells were harvested and FOXP3 mRNA expression was detected by means of real time RT-PCR. Horizontal line indicates the level of FOXP3 mRNA expression of freshly isolated CD4⁺CD25^{high} cells. Results are representative of 3 independent experiments performed with different donors.

not shown). However, results showed that FOXP3 expression did not correlate with functional activity since dexamethasone pre-treatment only increased suppressor ability of TGFβ Treg cells to a slight degree (40.3 ± 13.5% vs 46.3 ± 11.1%; n = 9; n.s.; ratio 1:1). In fact, when we compared the percentage of FOXP3 positive cells and the extent of suppression (Fig. 4b), we observed that CD25⁻Dex cells display a similar percentage of FOXP3 positive cells to TGFβ Treg cells (60.1 ± 21.1% vs 61.4 ± 5.8%, n.s.) but only TGFβ Treg were suppressive (11.4 ± 13.5% vs 40.3 ± 9.5%; ratio 1:1; p = 0.03). These data suggest that dexamethasone treatment leads to an increase in FOXP3 expression without a significant enhancement of regulatory ability.

As the anergic state of Treg cells is one of their prototypical functional features, we next sought to assess the proliferation ability of the expanded populations in response to mitogen stimulation. With this aim, the four different expanded populations as well as purified CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} cells were stimulated with PHA for 5 days using irradiated autologous PBMC as feeders. Cultures were pulsed with ³H-thymidine on day 4 and proliferation was assessed using a liquid scintillation counter. Results showed that all CD25⁺-generated cells, as well as purified nTreg cells, were hyporesponsive upon activation (Fig. 4c).

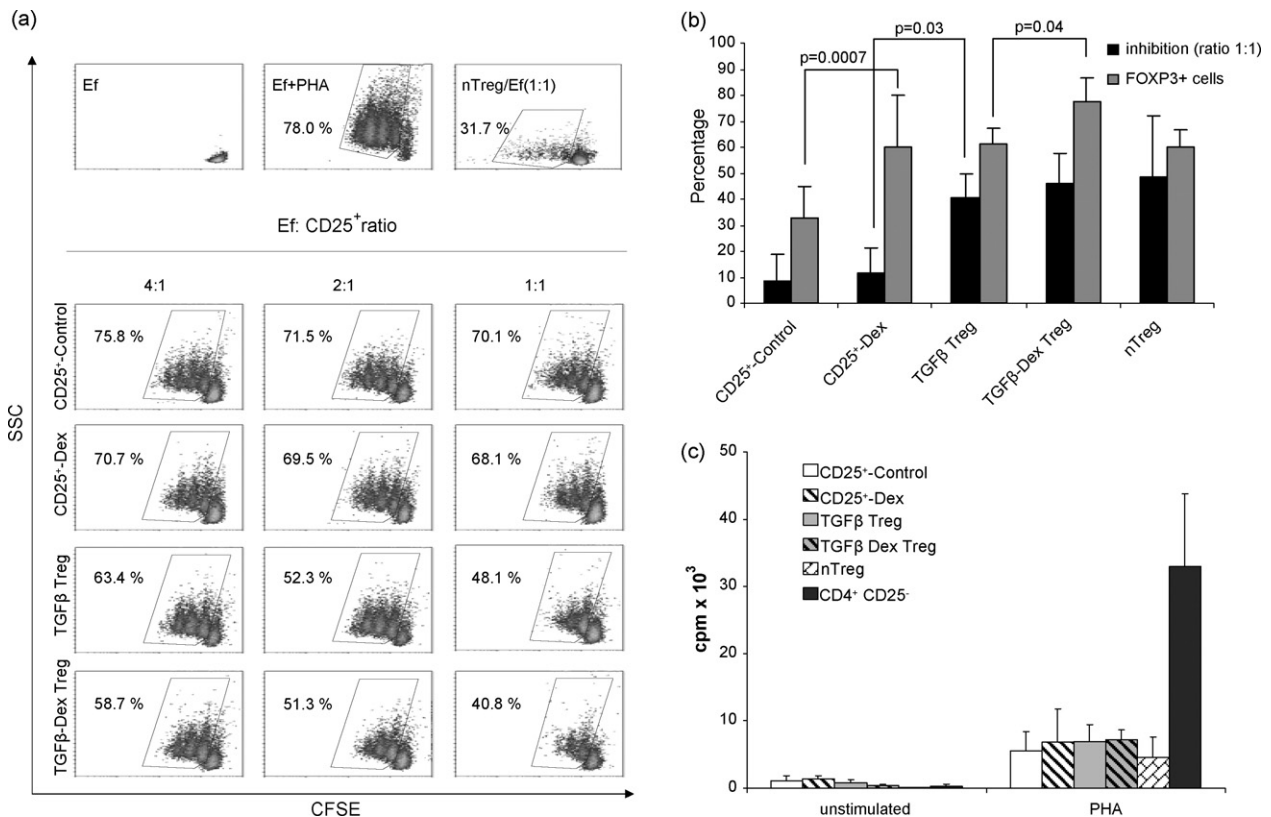


Fig. 4. Effect of dexamethasone on suppressive activity. (a) CD25⁻-Control, CD25⁻-Dex, TGFβ Treg and TGFβ-Dex Treg were tested for their functional activity by determining their ability to suppress the proliferation of autologous PBMC (effector cells, Ef) CFSE-labelled and stimulated with PHA. Proliferation was measured by flow cytometry after 4 days. Dot plots show the proliferation of stimulated effector cells co-cultured at various Ef:CD25⁺ ratios. PHA-stimulated effector cells cultured with nTreg cells at 1:1 ratio were used as positive control for suppression (upper-right plot). The upper-left dot shows the CFSE fluorescence peak of unstimulated effector cells and the upper-middle dot shows the CFSE dilution of PHA-stimulated effector cells cultured alone. Numbers show the percentage of divided cells. (b) Bars graph shows the percentage of FOXP3⁺ cells and inhibition at 1:1 ratio of the expanded populations and isolated nTreg cells. Dexamethasone treatment increases percentage of FOXP3⁺ cells but does not significantly enhance the suppressive capacity. Bars represent mean ± SD of at least 5 independent experiments carried out with different healthy donors. (c) Proliferation ability of nTreg and the four types of generated CD25⁺ cells in response to mitogen activation. CD25⁻-Control, CD25⁻-Dex, TGFβ Treg, TGFβ-Dex Treg, nTreg or CD4⁺CD25⁻ cells (5.0 × 10⁴) were stimulated with PHA by using 5.0 × 10⁴ irradiated autologous PBMC as feeder cells. Proliferation was measured on day 5 by ³H-thymidine uptake. Data represent mean ± SD of 3 independent experiments performed with different donors.

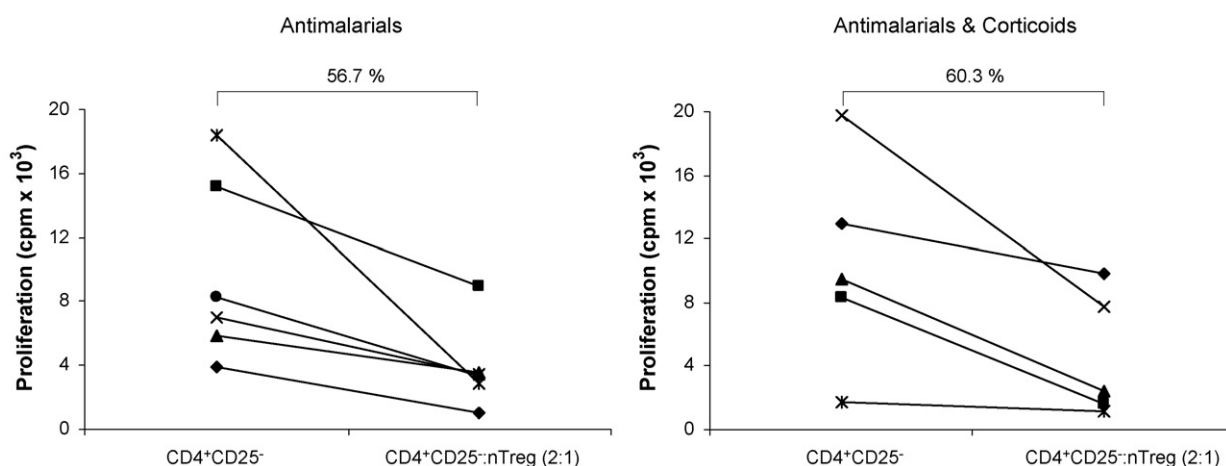


Fig. 5. Suppressive function of nTreg cells from SLE patients. Freshly isolated $CD4^+CD25^-$ cells from non-steroid-treated and steroid-treated SLE patients were stimulated with allogenic MDDC and cultured alone or in the presence of autologous $CD4^+CD25^{high}$ cells. Proliferation was assessed on day 5 by 3H -thymidine incorporation. The percentage of inhibition was calculated for each patient. The mean value for each treatment (56.7% vs 60.3%) is indicated.

Effect of glucocorticoid treatment on regulatory functions of $CD4^+CD25^{high}$ cells from SLE patients

We and others have previously reported an enrichment of $CD4^+CD25^{high}$ T cell population (Azab et al. 2008; Karagiannidis et al. 2004; Ling et al. 2007; Lopez et al. 2008; Suarez et al. 2006; Zhang et al. 2008) and FOXP3 (Karagiannidis et al. 2004; Ling et al. 2007; Lopez et al. 2008) in patients under glucocorticoid treatment. To ascertain the possible effect of this treatment on Treg suppressive activity, we carried out functional analysis by measuring the ability of purified $CD4^+CD25^{high}$ cells to suppress proliferation. To this end, we selected SLE patients with inactive disease, six receiving antimalarials (mean % of $CD4^+CD25^{high}$: 4.45 ± 0.83) and five receiving antimalarials and glucocorticoids (5.70 ± 3.69). For each patient, freshly isolated $CD4^+CD25^-$ cells were stimulated with allogenic MDDC and cultured alone or in the presence of autologous $CD4^+CD25^{high}$ cells (ratio 2:1). Proliferation was assessed by measuring 3H -thymidine uptake. As shown in Fig. 5, we did not find significant differences between the suppressive function of non-steroid-treated and steroid-treated patients' cells.

Discussion

A number of studies suggest that cells with phenotypic characteristics of nTreg cells, specifically FOXP3 expression, can be generated in the periphery or *in vitro* following activation of human naïve T cells (Abraham et al. 2008; Buckner & Ziegler 2004; Pillai et al. 2007; Walker et al. 2003) thus suggesting a potential therapeutic use of Treg-inducing agents. In this study, we demonstrated that short-term treatment with dexamethasone prior to cellular expansion upregulates mRNA and protein FOXP3 expression in human $CD25^-$ cells and generates $CD4^+CD25^{high}$ cells with phenotypic characteristics comparable to those of nTreg cells. However, our phenotypic analysis has been done by 3-colour flow cytometry, which may limit the conclusions we can reach. Moreover, dexamethasone treatment also increases FOXP3 levels in Treg cells generated *in vitro* with TGF β . This result and previous works highlight the effect of corticoids upregulating FOXP3 expression and suggest that they could be able to expand or to generate Treg cells (Abraham et al. 2008; Azab et al. 2008; Chen et al. 2006; Chung et al. 2004; Karagiannidis et al. 2004; Ling et al. 2007; Lopez et al. 2008; Somers et al. 2004; Suarez et al. 2006; Tai et al. 2008; Zhang et al. 2008).

The therapeutic attractiveness of generating or expanding Treg cells *in vitro* or *in vivo* is undoubted. Unfortunately, the most

relevant result of the current study is that, despite their phenotype and the high levels of FOXP3, dexamethasone-treated cells ($CD25^-Dex$) did not exhibit enhanced regulatory activity. Although various works have shown the effect of corticoids on FOXP3 expression, the impact on regulatory activity remains uncertain. It has been reported that treatment of human $CD4^+CD45RA^+$ cells with dexamethasone in the presence of IL-10 induce Tr1 function (Karagiannidis et al. 2004). However, to the best of our knowledge, this is the first work studying the anti-proliferative capabilities of human $CD4^+CD25^{high}$ cells generated *in vitro* from human $CD4^+CD25^-$ T cells expanded after short dexamethasone treatment.

On the other hand, our results confirm that TGF β -treatment induces FOXP3 expression and regulatory activity in human cells. Within this tolerogenic context, priming with dexamethasone significantly upregulated the level of FOXP3; however, this expression does not correlate with increased suppressor ability. Moreover, $CD25^-Dex$ cells showed similar expression of FOXP3 to TGF β Treg cells, corroborating the lack of correspondence between FOXP3 expression and regulatory function. These results point to the likelihood that, in addition to its upregulatory effect on FOXP3 expression, TGF β might be able to produce other unknown signals or mediators accounting for regulatory T cell activity.

Current and previous studies bring into question the role of FOXP3 in human cells. Given that FOXP3 expression in rodents is directly related to regulatory functions (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Ziegler 2006), it has been considered the most reliable marker for Treg cells. Therefore, it is reasonable to assume that FOXP3 elevating agents (e.g. dexamethasone or estrogens) could generate regulatory T cells from non-regulatory cells, at least in mice. However, our results have demonstrated that, in humans, it is possible to generate FOXP3 positive cells without noteworthy regulatory function. We can hence assume that reported differences between mice and humans (Ziegler 2006) exist not only as regards the expression, but also in the function of FOXP3. It became clear that the human FOXP3 gene is inducible following TCR activation (Mantel et al. 2006) and, given that FOXP3 is able to suppress the transcription of several genes (e.g. IL-2) (Schubert et al. 2001), it could play an important role in attenuating the effector functions of activated T cells. In fact, in common with other authors, we have shown a relationship between FOXP3 expression and hyporesponsiveness, suggesting a role of FOXP3 in the negative feedback loop of activated T cells. Thus, since dexamethasone has the capacity to enhance FOXP3 expression, the induction of anergy through FOXP3 upregulation could constitute an additional mechanism by means

of which glucocorticoids exert their immunosuppressive and anti-inflammatory activity. Taken together, these findings underscore the idea that FOXP3 is not a *bona fide* marker for Treg cells thus being suppressive activity the unique valid “marker” of Treg cells. In this respect, the enhancement of the number of CD4⁺CD25^{high} cells and of FOXP3 levels in patients treated with corticoids might not be related to increased regulatory activity. Actually, our results show that CD4⁺CD25^{high} cells from SLE patients under glucocorticoid therapy do not exhibit a more enhanced suppressive function than those from SLE patients not receiving this treatment. However, a prospective longitudinal study must be performed to confirm this result.

In summary, dexamethasone treatment upregulates mRNA and protein FOXP3 expression in activated T cells and Treg cells generated *in vitro* with TGFβ. However, dexamethasone-induced FOXP3 expression does not involve increased suppressor activity. Hence, employing FOXP3 as a human Treg cell marker must be done cautiously, especially in patients with systemic inflammatory diseases or those under glucocorticoid treatment.

Acknowledgements

The authors wish to thank ALAS (Asociación Lúpicas de Asturias) for its continuous encouragement. This work was supported by grants PI052409 and PI080570 from the Fondo de Investigación Sanitaria, IB08–091 from FICYT and by a grant from the Fundación Eugenio Rodríguez Pascual. Catuxa Prado was supported by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria.

References

- Abraham, M., Karni, A., Dembinsky, A., Miller, A., Gandhi, R., Anderson, D., Weiner, H.L., 2008. In vitro induction of regulatory T cells by anti-CD3 antibody in humans. *J. Autoimmun.* 30, 21–28.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., Levings, M.K., 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 19, 345–354.
- Allan, S.E., Passerini, L., Bacchetta, R., Crellin, N., Dai, M., Orban, P.C., Ziegler, S.F., Roncarolo, M.G., Levings, M.K., 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* 115, 3276–3284.
- Azab, N.A., Bassyouni, I.H., Emad, Y., bd El-Wahab, G.A., Hamdy, G., Mashahit, M.A., 2008. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin. Immunol.* 127, 151–157.
- Bacchetta, R., Gambineri, E., Roncarolo, M.G., 2007. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 227–235.
- Buckner, J.H., Ziegler, S.F., 2004. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res. Ther.* 6, 215–222.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25[−] naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-β induction of transcription factor FOXP3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chen, X., Murakami, T., Oppenheim, J.J., Howard, O.M., 2004. Differential response of murine CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25[−] T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur. J. Immunol.* 34, 859–869.
- Chen, X., Oppenheim, J.J., Winkler-Pickett, R.T., Ortaldo, J.R., Howard, O.M., 2006. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FOXP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells *in vivo* and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur. J. Immunol.* 36, 2139–2149.
- Chung, I.Y., Dong, H.F., Zhang, X., Hassanein, N.M., Howard, O.M., Oppenheim, J.J., Chen, X., 2004. Effects of IL-7 and dexamethasone: induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4⁺ cells. *Cell Immunol.* 232, 57–63.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2003. FOXP3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
- Franchimont, D., Galon, J., Vacchio, M.S., Fan, S., Visconti, R., Frucht, D.M., Geenen, V., Chrousos, G.P., Ashwell, J.D., O’Shea, J.J., 2002. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J. Immunol.* 168, 2212–2218.
- Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E.L., Greenberg, P.D., Ochs, H.D., Rudensky, A.Y., 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6659–6664.
- Gomez, J., Suarez, A., Lopez, P., Mozo, L., Diaz, J.B., Gutierrez, C., 2006. Systemic lupus erythematosus in Asturias, Spain: clinical and serologic features. *Medicine (Baltimore)* 85, 157–168.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3. *Science* 299, 1057–1061.
- Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N.J., Hense, G., Ruckert, B., Mantel, P.Y., Menz, G., Akdis, C.A., Blaser, K., Schmidt-Weber, C.B., 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1425–1433.
- Ling, Y., Cao, X., Yu, Z., Ruan, C., 2007. Circulating dendritic cells subsets and CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur. J. Haematol.* 79, 310–316.
- Lopez, P., Gomez, J., Prado, C., Gutierrez, C., Suarez, A., 2008. Influence of functional interleukin 10/tumor necrosis factor-α polymorphisms on interferon-α, IL-10, and regulatory T cell population in patients with systemic lupus erythematosus receiving antimalarial treatment. *J. Rheumatol.* 35, 1559–1566.
- Lopez, P., Mozo, L., Gutierrez, C., Suarez, A., 2003. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus* 12, 860–865.
- Mahic, M., Yaqub, S., Bryn, T., Henjum, K., Eide, D.M., Torgersen, K.M., Aandahl, E.M., Tasken, K., 2008. Differentiation of naive CD4⁺ T cells into CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1111–1117.
- Mantel, P.Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., Schmidt-Weber, C.B., 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J. Immunol.* 176, 3593–3602.
- Morgan, M.E., van Bilsen, J.H., Bakker, A.M., Heemskerk, B., Schilham, M.W., Hartgers, F.C., Elferink, B.G., van der, Z.L., de Vries, R.R., Huizinga, T.W., Ottenhoff, T.H., Toes, R.E., 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* 66, 13–20.
- Pillai, V., Karandikar, N.J., 2008. Attack on the clones? Human FOXP3 detection by PCH101, 236A/E7, 206D, and 259D reveals 259D as the outlier with lower sensitivity. *Blood* 111, 463–464.
- Pillai, V., Ortega, S.B., Wang, C.K., Karandikar, N.J., 2007. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin. Immunol.* 123, 18–29.
- Rao, P.E., Petrone, A.L., Ponath, P.D., 2005. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF-β. *J. Immunol.* 174, 1446–1455.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164.
- Schubert, L.A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F., Ziegler, S.F., 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* 276, 37672–37679.
- Somerset, D.A., Zheng, Y., Kilby, M.D., Sansom, D.M., Drayson, M.T., 2004. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25⁺ CD4⁺ regulatory T-cell subset. *Immunology* 112, 38–43.
- Suarez, A., Lopez, P., Gomez, J., Gutierrez, C., 2006. Enrichment of CD4⁺ CD25^{high} T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 1512–1517.
- Tai, P., Wang, J., Jin, H., Song, X., Yan, J., Kang, Y., Zhao, L., An, X., Du, X., Chen, X., Wang, S., Xia, G., Wang, B., 2008. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J. Cell Physiol.* 214, 456–464.
- Verhasselt, V., Vosters, O., Beuneu, C., Nicaise, C., Stordeur, P., Goldman, M., 2004. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4⁺ T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 762–772.
- Walker, M.R., Carson, B.D., Nepom, G.T., Ziegler, S.F., Buckner, J.H., 2005. De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4103–4108.
- Walker, M.R., Kaspravic, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van, L.M., Buckner, J.H., Ziegler, S.F., 2003. Induction of FOXP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺. *J. Clin. Invest.* 112, 1437–1443.
- Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van d, V., Huizinga, T.W., Toes, R.E., 2007. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 129–138.
- Zhang, B., Zhang, X., Tang, F., Zhu, L., Liu, Y., 2008. Reduction of forkhead box P3 levels in CD4⁺CD25^{high} T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 153, 182–187.
- Ziegler, S.F., 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 209–226.

Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients

Catuxa Prado¹, Banesa de Paz¹, Jesús Gómez², Patricia López^{1,3}, Javier Rodríguez-Carrio¹ and Ana Suárez¹

Abstract

Objective. To investigate the relative amounts of Th17 and Th1 cells present in SLE patients and the possible effects of treatments or disease features on these populations.

Methods. Peripheral blood mononuclear cells were collected from 75 SLE patients and 19 healthy controls and the proportion of Th17 and Th1 populations were assessed by flow cytometry measuring the amount of IL-17 and IFN- γ -producing cells. Gene expression of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3), STAT4, IL-6R and IL-12R were determined in 30 patients and 8 healthy individuals by real-time RT-PCR. Data were related to clinical and immunological parameters and to the treatment followed during the past 3 months.

Results. Th17 cells and the Th17/Th1 ratio were significantly increased in SLE patients treated with glucocorticoids compared with healthy individuals, untreated patients or those under other treatments. No association was detected with clinical parameters, but patients with anti-ENA antibodies also displayed increased Th17 responses. Disease activity (SLEDAI) is associated with the Th17/Th1 index only in glucocorticoid-treated patients. In line with these results, gene expression of STAT3 and IL-6R was up-regulated in patients taking these drugs. Accordingly, we found a positive correlation between the Th17/Th1 ratio and STAT3 levels.

Conclusions. The present work provides the first evidence that aberrant Th17/Th1 balance in SLE is linked to the use of glucocorticoids and suggests that the up-regulatory effect of these drugs on the Th17 population could be associated with their ability to increase STAT3 and IL-6R expression. Additionally, anti-ENA positivity could represent a potential biomarker for Th17 bias.

Key words: Systemic lupus erythematosus, Th17, Glucocorticoids, Signal transducers and activators of transcription 3.

Introduction

SLE is an autoimmune disorder in which chronic stimulation of the immune system results in inflammation that affects many organs. SLE patients are often treated with strong immunosuppressive regimens, including

glucocorticoids, cytotoxic drugs and anti-malarial compounds. Due to its anti-inflammatory effects, glucocorticoids are widely used to treat patients with autoimmune or inflammatory diseases; however, regimens used to treat many other autoimmune conditions cannot maintain disease control in most SLE patients. Therefore more aggressive approaches may be employed to provide transient reductions in disease activity, although they often do not induce remission or prevent end-organ damage. The reason why treatment of some SLE patients requires high glucocorticoid doses or other strong immunosuppressive regimens is not clear.

Glucocorticoids mainly act by binding to the intracellular glucocorticoid receptor. The complex then migrates to the nucleus, where it can bind to cognate DNA

¹Department of Functional Biology, Immunology Area, Faculty of Medicine, University of Oviedo, ²Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo and ³Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain.

Submitted 7 February 2011; revised version accepted 27 May 2011.

Correspondence to: Ana Suárez, Department of Functional Biology, Immunology Area, Faculty of Medicine, University of Oviedo, C/Julián Clavería s/n, Oviedo, Asturias, Spain. E-mail: anasua@uniovi.es

sequences [glucocorticoid responding elements (GREs)], present in the promoter of several immune and non-immune genes, modulating their transcription. In addition, glucocorticoids can function by interacting with other transcription factors and interfering with their actions. Actually, inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B) activity is thought to be the most important mechanism by which glucocorticoids exert their anti-inflammatory effects [1]. Moreover, in the past few years, several functional interactions between glucocorticoids and signal transducers and activators of transcription (STATs), which play a critical role in mediating signalling downstream of cytokine receptors, have been described, suggesting the existence of relevant biological implications [2].

It is known that glucocorticoid treatment is able to modulate the production of a variety of cytokines, the resulting cytokine milieu being critical to the development of distinct Th lineages. Linkage of certain cytokines to their receptors on the surface of naïve CD4⁺ T cells leads to the activation of specific STATs, which translocate into the nucleus and bind to target sequences in the promoter of various genes, thus resulting in the differentiation towards determinate Th lineage. In fact, STAT4, an IL-12 signal transducer, is required for Th1 generation [3], whereas STAT3 is the key signal transducer for most of the cytokines involved in Th17 generation, such as IL-6 [4, 5], IL-23 [5, 6] and IL-21 [7].

Production of IL-17 has been reported to be augmented in SLE patients [8–12], suggesting that this cytokine may

have a potential role in the pathogenesis of the disease. A previous work concerning IL-17 and IFN- γ -producing cells (Th17 and Th1, respectively) has suggested the existence of a Th17/Th1 imbalance in lupus patients [13]. Several hypotheses have been proposed to explain the alterations found in these populations; however, it remains unknown why IL-17 is increased in lupus and the possible effects of treatments on Th17 cells.

In the present work, we investigated the Th17/Th1 balance in SLE patients, analysing the amount of IL-17 and IFN- γ -producing cells and the gene expression of STAT3, STAT4 and the specific receptors for IL-6 and IL-12, demonstrating a relevant effect of glucocorticoids on the deviation towards a Th17 response observed in lupus patients.

Materials and methods

Subjects

Seventy-five patients with a diagnosis of SLE based on the ACR criteria were selected from the Asturian Register of Lupus [14, 15]. Nineteen sex- and age-matched healthy donors were used as controls. Information on clinical and immunological manifestations was obtained by reviewing clinical histories. At the time of sampling, disease activity was scored based on the SLEDAI and patients were also asked questions about the treatment they received over the previous 3 months (Table 1). This study has been performed in compliance with the Declaration of Helsinki

TABLE 1 Characteristics and disease parameters of SLE patients

Patients' characteristics	No treatment	Without corticoids	With corticoids
SLE patients (<i>n</i>)	12	32	31
Gender: Women/men	12/0	30/2	30/1
Age at diagnosis, mean (s.d.), years	34.25 (14.21)	37.41 (15.14)	33.52 (13.01)
Disease duration, mean (s.d.), years	8.36 (4.27)	13.99 (9.22)	11.71 (9.23)
Clinical manifestations, <i>n</i> (%)			
Malar rash	5 (41.7)	17 (53.1)	19 (61.3)
Discoid lesions	0 (0.0)	6 (18.8)	4 (12.9)
Photosensitivity	7 (58.3)	22 (68.8)	16 (51.6)
Oral ulcers	6 (50.0)	14 (43.8)	14 (45.2)
Arthritis	8 (66.7)	23 (71.9)	25 (80.6)
Serositis	3 (25.0)	4 (12.5)	6 (19.4)
Renal disorder	2 (16.7)	13 (40.6)	11 (35.5)
Neurological disorder	1 (8.3)	2 (6.3)	5 (16.1)
Haematological disorder	5 (41.7)	23 (71.9)	23 (74.2)
Presence of anti-dsDNA	7 (58.3)	24 (75.0)	24 (77.4)
Anti-dsDNA levels, mean (s.d.), U/ml	24.37 (30.79)	22.01 (36.07)	39.29 (85.32)
Presence of anti-ENA	3 (25)	20 (62.5)	13 (41.9)
Anti-SSA ⁺	3 (25.0)	16 (50.0)	10 (32.3)
Anti-SSB ⁺	1 (8.3)	8 (25.0)	5 (16.1)
Anti-RNP ⁺	0 (0.0)	6 (18.8)	6 (19.4)
Anti-Sm ⁺	0 (0.0)	2 (6.3)	7 (22.6)
Other treatment, <i>n</i> (%)			
Anti-malarials	–	32 (100)	22 (71.0)
Immunosuppressants ^a	–	3 (9.4)	12 (38.7)

^aAZA, CSA, mycophenolate mophetil or CYC.

and was granted ethical approval by the Regional Ethics Committee for Clinical Investigation. All participants provided written informed consent.

Production of intracellular cytokines

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from patients' and controls' blood samples by Ficoll-Hypaque density centrifugation. The 2×10^6 cells/ml were cultured in RPMI 1460 (Invitrogen, UK) supplemented with 10% of heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (Hyclone, USA) and stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (20 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) in the presence of $2 \mu\text{M}$ of monensin (all from Sigma Aldrich, Germany) at 37°C in 5% CO_2 . After 5 h of culture, cells were extracellularly stained with anti-CD4 APC, CD45RO FITC (BD Pharmingen) and then fixed, permeabilized (Cytofix/Cytoperm, BD Pharmingen) and intracellularly stained with anti-IFN- γ PerCP-Cy5.5 (eBioscience) and anti-IL-17 PE (eBioscience). Appropriate isotype controls (from BD Pharmingen) were used in every sample. Analysis was carried out after acquiring 20 000 CD4⁺ lymphocytes on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD) with FACSDiva Software 6.1.2 (BD).

RT-PCR analysis of gene expression

mRNA was isolated from whole-blood samples using the mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche Diagnostics, Germany). Reverse transcription was carried out using an RT² First Strand Kit (SABiosciences) and cDNA was amplified by the RT² SYBR[®] Green qPCR Master Mix (SABiosciences) in an ABI7900HT instrument. The $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method was used to calculate the fold induction relative to expression levels of CD4. The primer pairs used were designed and purchased from SABiosciences.

Statistical analysis

Results are expressed as median and interquartile range (IR). Differences between groups were evaluated by the Mann-Whitney U test. Correlations were carried out using Spearman's rank correlation test. All statistical analyses were performed using SPSS software (version 15.0). Graphs were drawn with GraphPad Prism software (version 4.0).

Results

SLE patients under glucocorticoid treatment have an impaired balance of Th17 and Th1 responses

A prior report has suggested that an imbalance between Th17 and Th1 responses could be a typical feature of lupus [13]. In an attempt to quantify these two subsets, we wanted to determine the amount of effector Th cell-expressing IL-17, IFN- γ or both cytokines in PBMCs from 75 lupus patients and 19 healthy controls. Thus we analysed by flow cytometry the production of these cytokines in the CD4⁺ population after 5 h of stimulation with ionomycin plus PMA. As expected, the majority of IL-17⁺ CD4⁺ and IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells expressed CD45RO both in patients and healthy controls (see

supplementary figure 1, available as supplementary data at *Rheumatology* Online); thus we analysed CD45RO⁺ effector Th cells expressing these cytokines. We noticed that the IL-17 mean fluorescence intensity (MFI) values were significantly higher in lupus patients compared with controls, whereas the IFN- γ MFI was slightly lower (Fig. 1A). No significant differences were observed in the frequency of IL-17⁺IFN- γ ⁻ (Th17) or IL-17⁺IFN- γ ⁺ (Th1) CD4⁺CD45RO⁺ cells between patients and controls, although the Th17/Th1 ratio was significantly increased in SLE patients. Nevertheless, this possible Th17 bias could be related to specific treatment or disease characteristics rather than represent a typical feature of SLE. In fact, Fig. 1B indicates that the Th17/Th1 ratio was strikingly increased in patients under glucocorticoid treatment [mean (s.d.) dose 7.56 (4.74) mg prednisone/day], whereas there were no significant differences between controls, untreated patients and those without glucocorticoid therapy. Accordingly, the frequency of Th17 cells and IL-17 MFI levels were increased and the Th1 subset and IFN- γ MFI were decreased in the group of patients taking corticoids, while double-positive IL-17⁺IFN- γ ⁺ cells were not altered (Fig. 1B and C). Moreover, Th17 bias seemed to be related to the dose of glucocorticoids because patients treated with <5 mg/day ($n=9$) did not present this effect.

Finally, we did not find a significant correlation between the Th17/Th1 index and SLEDAI score ($r=0.205$, $P=0.094$) or anti-dsDNA titre ($r=0.072$; $P=0.557$), suggesting that increased Th17 responses are independent of disease activity. In fact, untreated patients presented high SLEDAI scores (Fig. 2A). But, curiously, the SLEDAI score correlated positively with the Th17/Th1 ratio in corticoid-treated patients but not in other patient groups (Fig. 2B).

Increased Th17 responses in anti-ENA-positive patients

Then we assessed the possible association between a Th17/Th1 imbalance and particular clinical or immunological features. The analysis of clinical characteristics of SLE patients did not show significant differences in Th17 cells or the Th17/Th1 index. The presence of autoantibodies, however, seemed to be associated with Th17 responses. In fact, patients with antibodies against ENA (SSA, SSB, Sm or RNP) presented with a higher percentage of Th17 cells than anti-ENA-negative patients, whereas no differences were detected related to the presence of anti-dsDNA antibodies (Fig. 3A). Anti-ENA- and anti-DNA-positive and -negative patients showed similar levels of Th1 cells, except those anti-Sm-positive patients, who displayed lower percentages of Th1 cells (Fig. 3B).

Given that both anti-ENA-positive and glucocorticoid-treated patients presented with a higher percentage of Th17 cells, we analysed both effects together (Fig. 3C). All patients treated with glucocorticoids presented high Th17 levels and differences between those positive and negative for anti-ENA antibodies did not reach statistical significance [2.33 (1.60) vs 1.76 (1.24), $P=0.258$]. However, patients presenting anti-ENA antibodies who

Fig. 1 Th17 bias in SLE patients under glucocorticoid treatment. Th17, Th1 and IL17⁺IFN γ ⁺CD4⁺CD45RO⁺ cells were determined as described in the ‘Materials and methods’ section. **(A)** MFI values of IL-17 and IFN- γ , percentage of Th17 and Th1 and Th17/Th1 ratio from HCs and SLE patients. **(B)** Th17/Th1 ratio, Th17, Th1, IL17⁺IFN γ ⁺CD4⁺CD45RO⁺ cells and MFI values in HCs ($n=19$) and SLE patients classified according to treatment: untreated ($n=12$), taking <5 mg prednisone/day (GC < 5, $n=9$), at least 5 mg prednisone/day (GC ≥ 5 , $n=22$) and under other treatment (no GC, $n=32$). **(C)** Representative plots. Bars represent median (IR). * $P < 0.05$ compared with HC. HC: healthy controls; GC: glucocorticoids. n.t.: untreated patients.

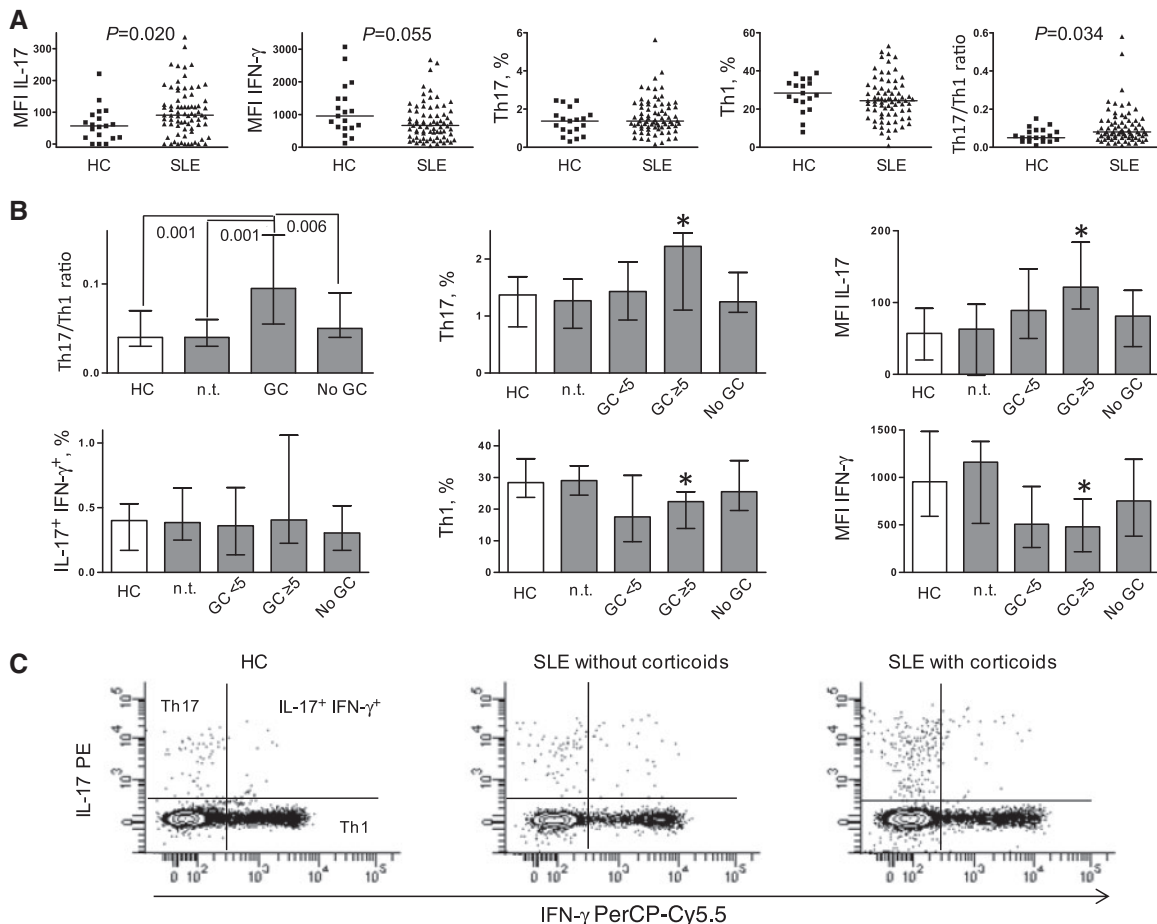


Fig. 2 Relation between Th17/Th1 index and SLEDAI score in patients under corticoid treatment. **(A)** SLEDAI score in SLE patients organized by treatment. Bars represent median (IR). **(B)** Correlations between Th17/Th1 index and SLEDAI in patients taking glucocorticoids and those under other treatments. n.t.: untreated patients.

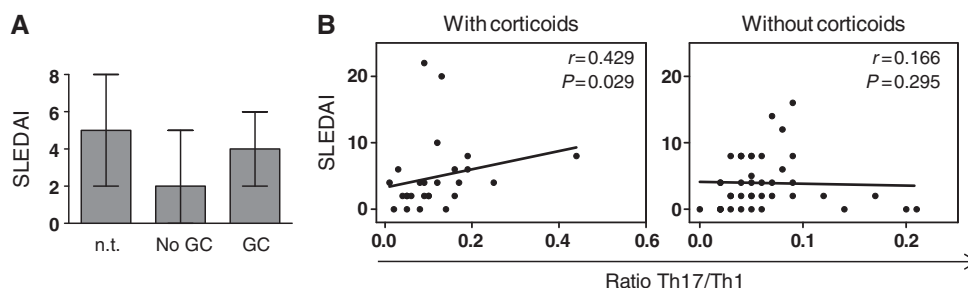
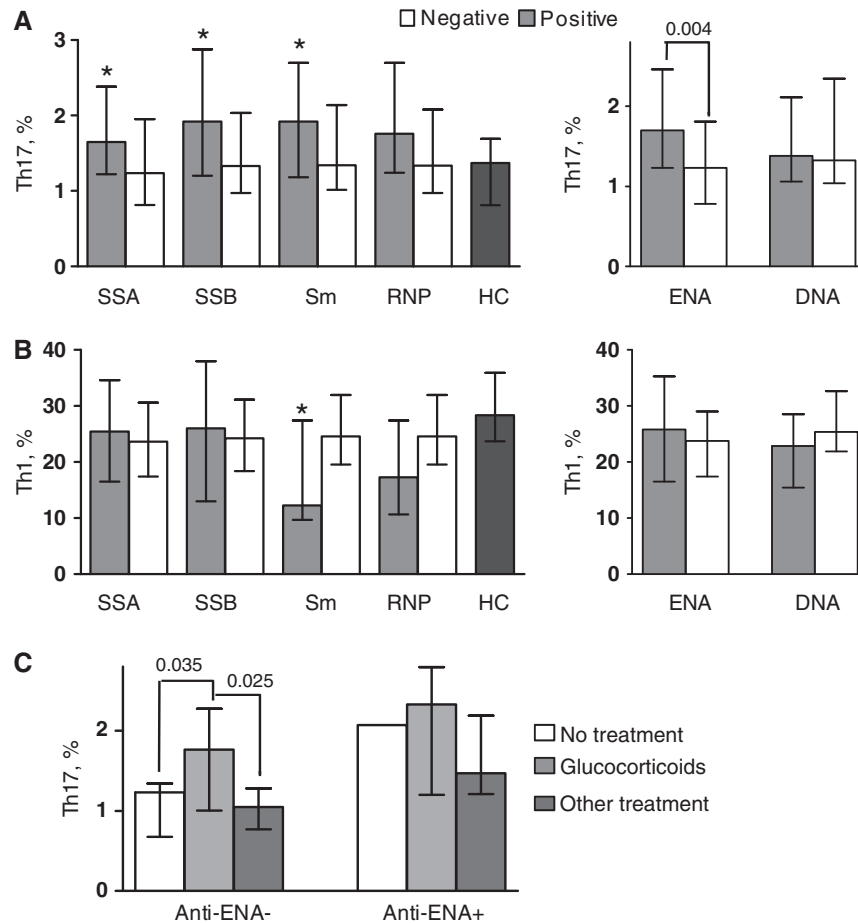


Fig. 3 Increased Th17 responses in anti-ENA-positive patients. **(A)** Th17 and **(B)** Th1 populations were analysed in SLE patients according to the presence or absence of autoantibodies against ENAs (SSA, SSB, RNP or Sm) or dsDNA. **(C)** Influence of treatment in anti-ENA-positive and -negative patients. Anti-ENA-negative: untreated ($n=9$), with glucocorticoids ($n=18$), with other treatment ($n=12$); anti-ENA-positive: untreated ($n=3$), with glucocorticoids ($n=13$), with other treatment ($n=20$). Bars represent median (IR). HC: healthy controls. * $P < 0.05$ compared with autoantibody-negative patients.



were users of another treatment did not show an elevated percentage of Th17 cells compared with healthy individuals [1.47 (0.98) vs 1.37 (0.88)].

STAT3 and IL-6R are up-regulated in SLE patients taking glucocorticoids

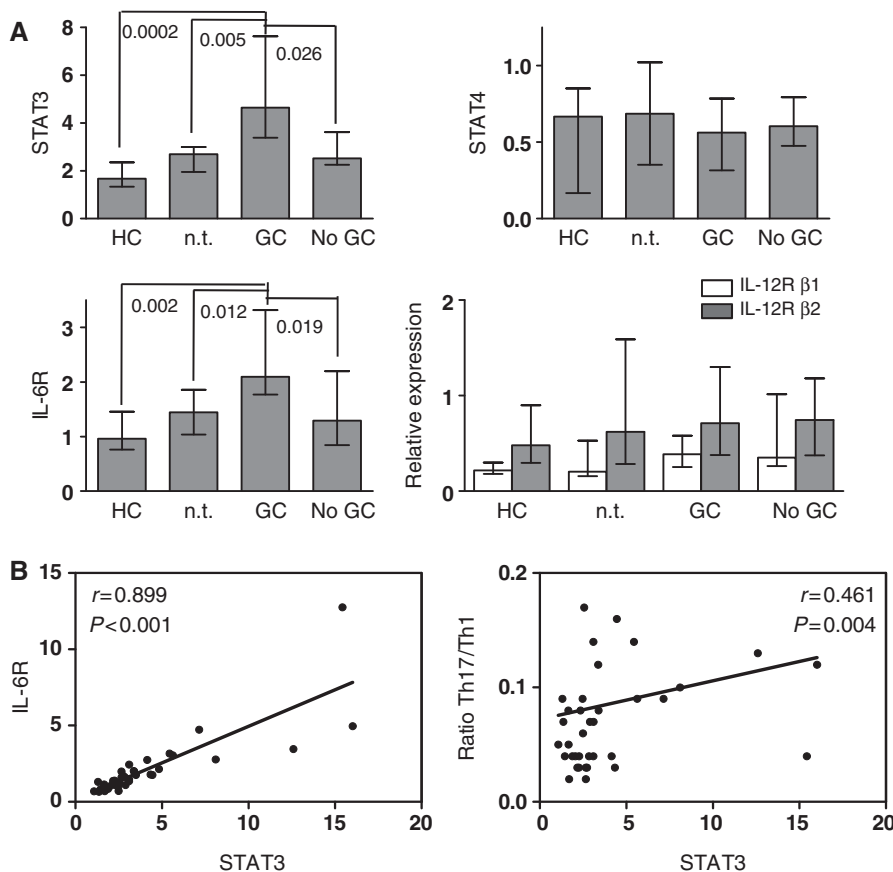
The differentiation of CD4⁺ T lymphocytes towards different Th lineages is mediated by cytokine binding to specific receptors, which leads to the activation of different STATs. Thus we sought to assess the effect of glucocorticoid treatment on CD4⁺ T cells from SLE patients quantifying gene expression of IL-6R and STAT3, involved in Th17 responses, and IL-12R and STAT4, required for Th1 generation. To this end we analysed the expression of these molecules in 30 SLE patients (non-treated: $n=6$; without glucocorticoids: $n=10$; with glucocorticoids: $n=14$) and 8 healthy controls at the time of the quantification of Th1 and Th17 cells by real-time RT-PCR. Figure 4A shows that patients receiving glucocorticoids [mean (s.d.) dose: 10.16 (7.58) mg/day]

presented higher STAT3 levels than other patients and healthy controls, whereas no significant differences were detected between controls, untreated patients and those with other treatments. STAT4 levels, however, did not show significant differences. In a similar way, IL-6R expression was significantly increased in corticoid-treated patients, whereas IL-12R levels ($\beta 1$ and $\beta 2$ chains) were similar in all the groups tested. As expected, a strong relationship was detected between STAT3 and IL-6R expression ($r=0.899$, $P < 0.001$) (Fig. 4B). Moreover, we found a positive correlation in all tested individuals between the Th17/Th1 ratio and gene expression of STAT3 ($r=0.461$, $P=0.004$) and IL-6R ($r=0.333$, $P=0.041$), thus supporting the relevance of these molecules for Th17 polarization.

Discussion

In this work, we show a link between the use of corticoids and alteration of the balance between Th17 and Th1

Fig. 4 STAT3 and IL-6R gene expression is up-regulated in SLE patients taking glucocorticoids. **(A)** mRNA relative expression of STAT3, STAT4, IL-6R, IL-12R β 1 and IL-12R β 2 were assessed using real-time RT-PCR as described in the 'Materials and methods' section. STAT3 and IL-6R are up-regulated in patients on GCs ($n = 14$) as compared with HCs ($n = 8$), n.t. ($n = 6$) and those on other treatments (no GC, $n = 10$). No differences were found on STAT4, IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA relative expression. Bars represent median (IR). **(B)** Correlations between STAT3 levels, IL-6R expression and Th17/Th1 ratio. GC: glucocorticoids; HC: healthy controls; n.t.: untreated patients.



populations observed in SLE patients. An increased proportion of Th17 cells [8–10] and a dysregulated Th17/Th1 index [13] have been previously described in SLE patients, suggesting a detrimental role of IL-17 production in the disease. In fact, several works have shown increased amounts of Th17 cells in patients with high SLEDAI scores [8, 10], and a positive correlation has been described between this population and disease activity [8, 10, 13]. However, to the best of our knowledge, this is the first study showing an enrichment of the Th17 population associated with the use of steroid treatment. Nevertheless, the majority of SLE patients with active disease included in previous reports were on glucocorticoid treatment, whereas inactive patients were not. In the present work, however, we studied a comparatively large number of SLE patients ($n = 75$), which included patients treated with corticoids and with other therapies, as well as untreated patients with high SLEDAI scores, thus avoiding this problem.

In our work, Th17 cells did not correlate with disease activity or anti-dsDNA titre, but, interestingly, they were

increased in patients with antibodies against ENA antigens. This result supports the different origin of autoantibodies in SLE. In fact, development of antibodies against SSA and SSB, two apoptosis-related molecules [16], are favoured by a pro-inflammatory environment [17, 18], whereas the presence of anti-dsDNA is associated with humoral response and high IL-10 levels [19, 20]. Therefore anti-ENA positivity at the onset of the disease could represent a potential biomarker for high Th17 bias, especially during the use of glucocorticoids, thus hampering the control of the disease under this treatment. Therefore, in patients presenting these autoantibodies, it would be advisable to use non-steroid therapies or low doses of steroids. However, a prospective longitudinal study must be performed to confirm this result.

In an attempt to determine a possible origin for the dysregulated Th17/Th1 balance in steroid-treated patients, we quantified the gene expression of STAT3 and STAT4, two signal transducers related to the development of Th17 [21] and Th1 [22] cells, respectively. In the same way, IL-6 is critical for the polarization of human

CD4⁺ T cells towards Th17 populations, probably because IL-6R signal through STAT3 [4]. In fact, our data showed a strong relationship between IL-6R and STAT3 expression. We found that SLE patients treated with glucocorticoids presented increased levels of STAT3 and IL-6R, in accord with the data of Th17/Th1 imbalance. Increased levels of STAT3, associated with high transcriptional activity of STAT3-inducible genes, have been previously reported in SLE patients [23]. Likewise, it has been suggested that the up-regulated IL-6 production reported in lupus patients [24–26] may play a role in the development of the disease. Actually, IL-6R-blocking therapies, used in RA [27] and other autoimmune diseases [28] can improve lupus symptoms [29], especially nephritis.

The fact that glucocorticoids increment IL-17 production may seem surprising, but is not contradictory with current knowledge. It has been shown that these drugs synergize with several cytokines, such as IL-6 or IL-10, rather than inhibit their activities [30–32]. Different levels of interactions have been reported in the synergism with IL-6. First studies showed that glucocorticoids were able to induce the expression of IL-6R [32]. More recently, a physical interaction has been discovered between glucocorticoids and IL-6-induced STAT3 [33]. Formation of the STAT3-glucocorticoid complex may explain the reason why STAT3 target genes can be superinduced in the presence of glucocorticoids, and also the fact that STAT3 could be a co-activator of GRE-mediated transcription. A similar synergism has been reported with IL-10 [34]. Glucocorticoids can increase IL-10 expression *in vivo* and *in vitro* [30, 31, 35] and it has been demonstrated that they induce the binding of STAT3 to the STAT motif of the IL-10 promoter [34]. Interestingly, a number of Th17-related cytokines signal through STAT3, so they could establish an analogous synergism with glucocorticoids. Thus the up-regulatory effect of glucocorticoids on IL-17 production in SLE patients could be a result of a superinduction of IL-17 gene mediated by IL-6R signalling through STAT3, despite the lack of identifiable GREs on IL-17 promoter. However, other direct or indirect mechanisms could be involved in the effect of glucocorticoids on Th17/Th1 balance.

Rheumatology key messages

- SLE patients treated with glucocorticoids display an alteration in the Th17/Th1 balance.
- Expression of STAT3 and IL-6R, involved in Th17 differentiation, are up-regulated in steroid-treated patients.
- Anti-ENA positivity could be used as a potential biomarker for Th17 bias.

Acknowledgements

The authors wish to thank ALAS (Asociación Lúpicos de Asturias) for its continuous encouragement.

Funding: This work was financed by European Union FEDER funds, the Fondo de Investigación Sanitaria (PI080570), and the Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (IB08-091). C.P. was supported by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria and B.d.P. by a fellowship from the Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology* Online.

References

- 1 McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999;20:435–59.
- 2 Rogatsky I, Ivashkiv LB. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* 2006;68:1–12.
- 3 Good SR, Thieu VT, Mathur AN *et al*. Temporal induction pattern of STAT4 target genes defines potential for Th1 lineage-specific programming. *J Immunol* 2009;183:3839–47.
- 4 Nishihara M, Ogura H, Ueda N *et al*. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol* 2007;19:695–702.
- 5 Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R *et al*. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007;282:9358–63.
- 6 Chen Z, Laurence A, Kanno Y *et al*. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:8137–42.
- 7 Wei L, Laurence A, Elias KM, O’Shea JJ. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 2007;282:34605–10.
- 8 Yang J, Chu Y, Yang X *et al*. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:1472–83.
- 9 Henriques A, Ines L, Couto M *et al*. Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol* 2010;264:97–103.
- 10 Dolf S, Quandt D, Wilde B *et al*. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R150.
- 11 Mok MY, Wu HJ, Lo Y, Lau CS. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2010;37:2046–52.
- 12 Chen XQ, Yu YC, Deng HH *et al*. Plasma IL-17A is increased in new-onset SLE patients and associated with disease activity. *J Clin Immunol* 2010;30:221–5.

- 13 Shah K, Lee WW, Lee SH *et al.* Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R53.
- 14 Gomez J, Suarez A, Lopez P, Mozo L, Díaz JB, Gutiérrez C. Systemic lupus erythematosus in Asturias, Spain: clinical and serologic features. *Medicine* 2006;85:157–68.
- 15 Lopez P, Mozo L, Gutierrez C, Suárez A. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus* 2003;12:860–5.
- 16 Clancy RM, Neufing PJ, Zheng P *et al.* Impaired clearance of apoptotic cardiocytes is linked to anti-SSA/Ro and -SSB/La antibodies in the pathogenesis of congenital heart block. *J Clin Invest* 2006;116:2413–22.
- 17 Bombardieri M, Barone F, Pittoni V *et al.* Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjogren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R447–56.
- 18 Suarez A, Lopez P, Mozo L, Gutiérrez C. Differential effect of IL10 and TNF{alpha} genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1605–10.
- 19 Llorente L, Zou W, Levy Y *et al.* Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1995;181:839–44.
- 20 Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renaud JC. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 1995;4:393–5.
- 21 Harris TJ, Grosso JF, Yen HR *et al.* Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 2007;179:4313–17.
- 22 Thieu VT, Yu Q, Chang HC *et al.* Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 2008;29:679–90.
- 23 Harada T, Kytтары V, Li Y, Juang YT, Wang Y, Tsokos GC. Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration. *Autoimmunity* 2007;40:1–8.
- 24 Chun HY, Chung JW, Kim HA *et al.* Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2007;27:461–6.
- 25 Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol* 1991;147:117–23.
- 26 Peterson E, Robertson AD, Emlen W. Serum and urinary interleukin-6 in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1996;5:571–5.
- 27 Nishimoto N, Ito K, Takagi N. Safety and efficacy profiles of tocilizumab monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis: meta-analysis of six initial trials and five long-term extensions. *Mod Rheumatol* 2010;20:222–32.
- 28 Ito H, Takazoe M, Fukuda Y *et al.* A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:989–96.
- 29 Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH *et al.* Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum* 2010;62:542–52.
- 30 Dandona P, Aljada A, Garg R, Mohanty P. Increase in plasma interleukin-10 following hydrocortisone injection. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1141–4.
- 31 Gayo A, Mozo L, Suarez A, Tuñon A, Lahoz C, Gutiérrez C. Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 1998;85:122–30.
- 32 Nesbitt JE, Fuller GM. Differential regulation of interleukin-6 receptor and gp130 gene expression in rat hepatocytes. *Mol Biol Cell* 1992;3:103–12.
- 33 Zhang Z, Jones S, Hagood JS, Fuentes NL, Fuller GM. STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* 1997;272:30607–10.
- 34 Unterberger C, Staples KJ, Smallie T *et al.* Role of STAT3 in glucocorticoid-induced expression of the human IL-10 gene. *Mol Immunol* 2008;45:3230–7.
- 35 Mozo L, Suarez A, Gutierrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy* 2004;34:406–12.

TITLE: Relationship between FOXP3 positive populations and cytokine production in systemic lupus erythematosus

Authors: Catuxa Prado^a, Banesa de Paz^a, Jesús Gómez^b, Patricia López^a, Javier Rodríguez-Carrio^a and Ana Suárez^{a,*}

a. Department of Functional Biology, Immunology Area, Faculty of Medicine. C/ Julián Clavería s/n. University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain.

b. Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, C/ Julián Clavería s/n. Oviedo, Asturias, Spain.

* **Corresponding author:** Dr. Ana Suárez. Dpto. Biología Funcional (Área de Inmunología). Facultad de Medicina, 4ª planta. C/ Julián Clavería s/n. Oviedo, Asturias, Spain. Telephone: (+34) 985102789; Fax: (+34) 985103534. E-mail: anasua@uniovi.es

E-mail addresses:

Catuxa Prado: pradocatuxa@uniovi.es

Banesa de Paz: banessina@hotmail.com

Jesús Gómez: jegomez2000uk@yahoo.com

Patricia López: lopezpatricia@uniovi.es

Javier Rodríguez-Carrio: javiercarrio@hotmail.com

Key words: FOXP3, SLE, Treg, IL-17

LIST OF ABBREVIATIONS

SLE: systemic lupus erythematosus

FOXP3: forkhead box protein 3

Treg: regulatory T cells

Th: CD4⁺ T helper cells

ABSTRACT

In this work we studied CD4⁺FOXP3⁺ populations in systemic lupus erythematosus (SLE) and the relationship with Th cytokine production. We found an increment in CD25⁻FOXP3⁺ population in SLE associated with CD4⁺ downregulation and disease progression. CD25^{low} cells were also upregulated and showed increased percentages of FOXP3⁺ and CD127^{-/low} cells, supporting the activated status of SLE lymphocytes. Despite the normal levels of CD25^{high}FOXP3⁺ cells, the negative correlations observed in controls with the frequency of IFN γ , TNF α and IL-10 secreting cells were disrupted in patients, supporting a defective Treg function. Also, CD25^{high} cells showed an altered balance in the production of these cytokines. In addition, CD25^{high}FOXP3⁺ cells correlated directly with IL-17 and IL-8 but not with TGF β in SLE. The increased proportion of IL-17⁺ cells among the CD25^{high} subset and the positive correlation between IL-17 levels and Treg cells suggest a trans-differentiation of Treg into Th17 cells in SLE.

1.- INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a prototypical autoimmune disorder caused by the breakdown in immune self-tolerance and characterized by a broad clinical spectrum and presence of autoantibodies against a variety of intracellular targets. Many abnormalities on both effector and regulatory CD4⁺ T lymphocytes have been described in SLE patients, including dysregulated intracellular signal transduction, defective apoptosis and imbalanced cytokine production, which influence B cell function and anomalous autoantibodies production.

Consistent evidence suggests that induction and maintenance of peripheral tolerance is in great part carried out by natural regulatory T (Treg) cells, a population of CD4⁺ lymphocytes which express FOXP3 and high levels of CD25 and actively suppress the activation and expansion of self-reactive T cells [1]. In healthy individuals, Treg cells constitute 1-2% of the CD4⁺ lymphocytes in peripheral blood and display potent suppressive activity, inhibiting the production of TNF α and IFN γ , among others. Many groups have evaluated the role of the Treg population in the pathogenesis of autoimmune diseases, reporting most of them reduced levels or impaired function in several pathologies. In SLE, contradictory results have been published and it remains controversial as to whether or not the frequency or the function of Treg cells are altered [2]. These heterogeneous results could be partly explained by the use of different methodologies to quantify and isolate Treg cells or to determine their suppressive capability. Although FOXP3 has been widely used to identify thymus derived CD4⁺CD25^{high} naturally occurring Treg cells [3], it is well known that this transcription factor is also expressed in peripheral induced Treg [4] and even in human activated T

cells without suppressive activity [5]. Besides CD25 and FOXP3, other surface markers, like CD127^{-/low}, CD45RO⁺, CTLA-4⁺ and GITR⁺, have been commonly used to identify Treg population but, unfortunately, this phenotype is also shared by activated or memory Th cells. Besides, more recently researchers have paid attention to a little known subpopulation of FOXP3⁺ CD4⁺ cells lacking CD25 expression, since it has been found to be augmented in peripheral blood from lupus patients [6-9]. Nevertheless, the function and the clinical significance of CD4⁺CD25⁻ cells, as well as the reason why this subpopulation is increased in SLE, remain unknown.

It has been proposed that conventional CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells control immune responses to self and foreign antigens mainly by inhibiting the proliferation and/or the function of effector T cells, thus blocking the production of proinflammatory cytokines and maintaining an adequate balance between effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. In spite of this, a substantial Treg plasticity has been described in the last years. Specifically, Treg cells have shown to be capable of assuming Th17 effector functions under certain conditions, such as the presence of a proinflammatory environment [10-12]. The development of both Treg and Th17 cells is critically dependent on the cytokine milieu, with IL-1 β and IL-6 driving CD4⁺ T cells to secrete IL-17 [13], a cytokine that acts on a broad range of cell types to induce the production of inflammatory mediators, including IL-8 [14] and GM-CSF [15]. On the contrary, TGF β 1 plays a fundamental role in the induction and maintenance of Treg cells and seems to be involved in their antiproliferative function [16].

In this work we investigated the different FOXP3⁺ populations present in SLE patients and healthy controls and, aimed to evaluate their putative suppressive function, the possible relationship with Th effector populations and cytokine serum levels.

2.-MATERIALS AND METHODS

2.1.-Patients and controls

The study included 75 SLE patients selected from the Asturian Register of Lupus [17,18], 8 of them with a disease duration of less than 1 year. All patients fulfilled at least 4 of the American College of Rheumatology criteria for SLE. Information on clinical and immunological manifestations was obtained by reviewing clinical histories. Disease activity was scored at the time of sampling based on the SLE disease activity index (SLEDAI) and anti-dsDNA titer. Patients were also asked questions about the treatment they received over the previous three months. Twenty-nine sex and age-matched healthy blood donors were used as controls (25 women and 4 men; mean age \pm SD: 44.6 ± 12.2). All participants provided written informed consent according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the regional Ethics Committee for Clinical Investigation.

2.2.-Phenotypic analysis of CD4⁺ T cells

Expression of Treg markers on CD4⁺ T cells from patients and controls were determined by multiparametric flow cytometry. Whole blood cells were extracellularly stained with CD4 APC-Cy7, CD25 FITC, CD45RO APC (purchased from BD Pharmingen, California, USA) and anti-CD127 PE-Cy7 (eBiosciences) or with the corresponding isotype-matched and fluorochrome-matched controls (BD Pharmingen). To assess FOXP3 expression, cells were fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-FOXP3 PE (clone PCH101) or isotype control following the manufacturer's instructions for whole blood (Human FOXP3 staining kit, eBiosciences). The lymphocyte population was gated according to forward and side-scattered properties and CD4⁺ T

cells were gated using anti-CD4 antibodies. Isotype controls were used to set up the negative population and, according to the intensity of CD25 expression, CD4⁺CD25⁺ T cells were subdivided into CD25^{low} and CD25^{high} populations. These two cellular subsets were further characterized by multiparametric phenotypic analysis after acquiring 10 000 CD4⁺ lymphocytes. Analyses were carried out on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Pharmingen) with FACSDiva Software 6.1.2 (BD Pharmingen).

2.3.-Production of intracellular cytokines

Intracellular accumulation of cytokines was evaluated at the single cell level by flow cytometry after stimulation of isolated cells in the presence of a Golgi inhibitor. To this end, PBMC were separated from heparinised blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and resuspended at a concentration of 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium (Invitrogen, UK) supplemented with 10 % of heat inactivated FCS (Hyclone, USA), penicillin (20 U/ml) and streptomycin (20 µg/ml). Isolated cells were stimulated with 20 ng/ml of PMA and 500 ng/ml of ionomycin in the presence of 2 µM of monensin (all of them from Sigma Aldrich, Germany) for 5 hours at 37 °C in 5% CO₂. After that, cells were washed twice with PBS + 3% FCS and stained for surface markers with anti-CD4 APC and anti-CD25 PE-Cy7 (BD Pharmingen). Then cells were fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-IL-10 PE (BD Pharmingen) and anti-TNFα PerCP-Cy5.5 (eBioscience) or with anti-IL-17 PE and anti-IFNγ PerCP-Cy5.5 (from eBioscience). Fixation and permeabilization were carried out using the Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Pharmingen) following the manufacturer's recommendations. The corresponding isotype and fluorochrome-matched controls were used to set up quadrants. A minimum of 10 000 CD4⁺ T

lymphocytes were acquired and analyzed (BD FACSCanto II). Results are expressed as the percentage of positive cells or as the MFI of the gated population.

2.4.- Cytokine quantification in serum samples

The amounts of IFN α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-17 were quantified by flow cytometry using BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets or BD™ CBA Enhanced Sensitivity Flex Sets. The detection limits were: IFN α : 1.5 pg/ml; IL-8: 1.2 pg/ml; IL-1 β : 48.4 fg/ml; IL-6: 68.4 fg/ml; IL-17: 26.1 fg/ml. The concentration of TGF β 1 was measured by ELISA (Human TGF β 1 ELISA Set, BD OptEIA™). The detection limit was 11.9 ng/ml.

2.5.- Statistical analysis

Values are shown as median and interquartile range (IR) throughout the manuscript unless otherwise stated. Mann-Whitney U test was used to evaluate differences between groups. Correlations between variables were carried out using Spearman's rank correlation test. All statistical analyses were performed using the SPSS software (version 15.0). Graphs were drawn with GraphPad Prism software (version 4.0).

3.- RESULTS

3.1.- Increased number of CD25⁻ FOXP3⁺ cells in SLE patients

We determined the frequency and phenotype of FOXP3⁺ cells with different CD25 expression in CD4⁺ lymphocytes from 29 healthy controls and 75 SLE patients, 8 of them diagnosed during the last year (Fig 1A). Demographic and clinical details of patients are given in Table 1. SLEDAI score, anti-dsDNA titer and IFN α levels were determined as indicators of disease activity. Table 2 shows that the amount of total

FOXP3⁺ and FOXP3⁺CD127^{-/low} cells was significantly higher in SLE patients compared to healthy controls (HC). However, levels of CD25^{high}FOXP3⁺ and CD25^{high}CD127^{-/low} cells, the so-called natural Treg, were similar in patients and controls, whereas the proportion of CD25⁻ and CD25^{low} cells expressing FOXP3⁺ was strikingly increased in patients. Of note, CD25^{low} cells were significantly augmented in SLE patients, while CD25⁻ cells were reduced. Furthermore, the amount of CD127^{-/low} cells expressing low CD25 levels was also higher in patients compared with controls, thus suggesting an activated condition of SLE lymphocytes.

No significant differences were detected in any FOXP3⁺ CD4⁺ T cell subset related to treatment or disease activity, however, CD25⁻ and CD25^{low} FOXP3⁺ cells were inversely correlated with the amount of CD4⁺ lymphocytes (Fig 1B). Moreover, we also found that CD4⁺ T cells dropped in parallel with an increment in the size of CD25⁻ CD45RO⁺ population (Fig 1B), thus suggesting a selective reduction of FOXP3⁻ CD45RO⁻ CD25^{-/low} CD4⁺ lymphocytes in SLE patients.

As expected, CD4⁺ T cells were downregulated in our SLE patient group (40.74±9.46% vs 33.45±10.97%; p=0.002), but a striking reduction was only found in patients with established disease (32.97±11.26%), whereas no significant decline was observed in patients with relatively recent onset (less than 1 year) (37.44±7.64%). Thus, since CD25⁻ population was significantly reduced in our patient group (Table 2), we analyzed the percentage of FOXP3⁺ cells out of CD25⁻, CD25^{low} and CD25^{high} subsets in SLE patients classified according to disease duration. Fig 1C shows that patients with disease duration longer than 1 year presented significantly raised frequency of FOXP3⁺ cells in the CD25⁻ CD4⁺ subset. However, among CD25^{low} cells, the highest amount of FOXP3⁺ cells was displayed by SLE patients diagnosed in the last year, a patient group that also

presented the highest SLEDAI score, anti-dsDNA titer and IFN α levels (Fig 1D), thus suggesting once again that CD25^{low} FOXP3⁺ cells may include activated lymphocytes in patients with active disease.

Differences in CD25⁺FOXP3⁺ population between recent onset patients and those with longer disease duration did not seem to be related to treatment or disease activity. In fact, just two patients with recent onset were users of high corticoid dose (20 mg/day) and presented active disease (SLEDAI score: 22 and 6; anti-dsDNA titer: 400 and 56 U/ml), but they presented low amount of FOXP3⁺ cells in the CD25⁺ subset (3.35% and 4.22%). The others recent onset patients were untreated (n=5) or under antimalarial treatment (n=1). All these results suggest that the upregulation of Treg markers on the CD25⁺ population does not associate with disease activity or treatment followed.

3.2.- Association between CD25^{high}FOXP3⁺ cells and cytokine producing cells

In an attempt to evaluate the *in vivo* functional ability of the distinct FOXP3 subpopulations, we analysed their possible relationship with the amount of memory CD4⁺ effector cells determined *ex-vivo* in SLE and HC. To this end, we analysed by flow cytometry the intracellular accumulation of IL-10, TNF α , IL-17 and IFN γ in CD45RO⁺ CD4⁺ T cells after 5 h of stimulation with ionomycin and PMA (Fig 2A), in parallel with the analysis of FOXP3 and CD25 expression. Fig 2B shows that in HC the percentages of CD4⁺ CD45RO⁺ lymphocytes producing either IFN γ , TNF α or IL-10, were negatively correlated with the frequency of CD25^{high}FOXP3⁺ cells, supporting that this conventional Treg population plays a role in controlling effector Th functions and cytokine production. We did not find, however, any significant correlation in SLE patients, suggesting that the *in vivo* function of these cells may be impaired in lupus. On the other hand, neither HC nor SLE patients displayed significant correlations between

the percentages of CD25⁻ or CD25^{low} FOXP3⁺ cells and the number of cytokine producing cells. Thus, these FOXP3⁺ populations do not seem to be involved in regulating the production of these cytokines.

Interestingly, we noticed that neither CD25^{high}FOXP3⁺ cells from HC nor SLE patients correlated with the percentage of IL-17⁺ cells (Fig 2B). In addition, we found that the frequency of CD25^{high} cells that produce IL-17 in lupus was slightly increased in patients with active disease (HC: 0.95 (1.12); SLEDAI \leq 6: 1.02 (1.16); SLEDAI $>$ 6: 1.65 (1.05)). These data seem to suggest that CD25^{high} cells from lupus patients are more prone to secrete IL-17 rather than suppress its production. In fact, IL-17⁺/FOXP3⁺ ratio within CD25^{high} cells was significantly higher in active SLE patients compared with HC (Figure 2C), indicating the existence of an important shift in the function of CD25^{high} from SLE patients. Similarly, we found that IL-17⁺/IFN γ ⁺ and IL-17⁺/TNF α ⁺ balances in CD25^{high} cells from active patients were significantly increased (Figure 2C), confirming that CD25^{high} cells from SLE are different from those from healthy individuals. On the contrary, no differences were detected among CD25^{-/low} cells.

3.3.- Cytokine serum levels and their relationship with CD4⁺FOXP3⁺ cells.

Since both FOXP3⁺ and Th17 cells seem to be involved in the pathogenesis of SLE, we wanted to investigate the possible relationship between several cytokines, related to the generation or the effector functions of Th17 and Treg cells, and the alterations found in FOXP3⁺ cells from lupus patients. To this end, we measured IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, TGF β 1 and GM-CSF in the serum of SLE patients and HC. We found increased levels of IL-6 in patients compared with HC (mean \pm SD: 0.68 \pm 0.86 vs 2.74 \pm 4.30 pg/ml, p=0.0002). Also, IL-8 and GM-CSF were upregulated in SLE (IL-8: 13.3 \pm 8.0 vs 42.0 \pm 78.6 pg/ml, p=0.0001; GM-CSF: 2.31 \pm 3.23 vs 4.3 \pm 6.05 pg/ml, p=0.014) whereas

the concentration of TGF β was found to be decreased in our patient group (19.1 ± 4.2 vs 13.8 ± 4.1 ng/ml, $p \leq 0.001$). No significant differences were detected in the levels of IL-1 β (101.2 ± 169.2 vs 257.5 ± 582.2 fg/ml) and IL-17 (5.2 ± 20.8 vs 7.8 ± 13.0 pg/ml).

As expected, TGF β serum levels correlated positively with the frequency of CD25^{high}FOXP3⁺ cells in HC, but this association was not present in SLE patients (Figure 3A). Instead, the number of CD25^{high}FOXP3⁺ cells in SLE was positively correlated with serum levels of IL-17 and IL-8 and negatively with IL-6 (Figure 3B). This association between Treg cells and IL-17 levels in patients supports the previous suggestion that CD25^{high} cells in SLE could secrete IL-17. On the other hand, the percentage of CD25⁻ or CD25^{low} FOXP3⁺ cells was not associated with the amount of any tested cytokine, confirming the observations made in the experiments to test the *ex vivo* production of cytokines.

4.- DISCUSSION

This work describes significant alterations in the FOXP3⁺ population of SLE patients which could be relevant in the pathogenesis of the disease. First, we showed that CD25⁻ FOXP3⁺ cells were considerably increased in patients compared with controls, supporting the idea that FOXP3 expression is dissociated from that of CD25. These results are in line with recent reports [6-9] and suggest that presence of increased FOXP3⁺ cells lacking CD25 expression could be a typical feature of SLE. Nevertheless, the source of this population and the reason why it is increased in lupus remains unknown. These cells are habitually present in all individuals, actually, a half of the total circulating CD4⁺FOXP3⁺ cells in our healthy group belong to the CD25⁻ subset, but this figure rises to 70% in SLE patients. This enhancement could be secondary to changes in inflammatory status or specific clinical features, although, in contrast with

other reports [6, 9, 19], we did not find any association with disease activity. However, our data suggest that the increase in this population could be influenced by the progression of the immune disorder, since the proportion of FOXP3⁺ cells among the CD25⁻ subset is higher in patients with a disease duration longer than one year compared to those with recent onset or with healthy controls. In view of this data, we can hypothesize that the expression of FOXP3 in CD25⁻ cells could be an autoregulatory mechanism to induce T cell anergy, a FOXP3 associated feature in non-suppressive cells [5, 20]. Our results also indicated that this enhancement was associated with the downregulation of CD4⁺ lymphocytes. The strong negative correlation detected between the size of CD4⁺ and FOXP3⁺ populations ($r=-0.421$, $p<0.0001$) suggests that the increased proportion of CD25⁻FOXP3⁺ cells in SLE could be due to the higher resistance to apoptosis of these lymphocytes. Although increased apoptosis were widely observed in SLE [21, 22], they affect especially to naïve CD4⁺CD45RA⁺ lymphocytes [22], thus explaining the negative correlation between the amounts of CD4⁺ and CD25⁻CD45RO⁺ cells. Actually, most of the CD25⁻FOXP3⁺ cells from lupus patients are CD45RO⁺, whereas this cell subset in healthy controls is mainly made up of CD45RA⁺ cells [8,19]. Besides, the enhanced CD25⁻FOXP3⁺ population reported by other authors in SLE [6-8,19], could be related to disease progression, since they did not include recent onset patients. However, our results are in disagreement with the study published by Zhang et al. [9], that shows increased numbers of CD25⁻FOXP3⁺ cells in untreated new onset lupus patients. This contradiction could be partially explained by patient selection, because some of our recently diagnosed lupus patients were under treatment, and it has been reported that CD25⁻FOXP3⁺ cells decreased in most active patients after treatment [9]. Furthermore, given that FOXP3 is also expressed by human activated CD4⁺ lymphocytes, the CD25⁻FOXP3⁺ population of untreated new onset active

patients reported by Zhang et al, could include activated lymphocytes, since human CD25 expression is a continuum and it is very difficult to define or standardize CD25⁻, CD25^{low} and CD25^{high} populations. In fact, our recent onset patient group showed the highest percentage of CD25^{low}FOXP3⁺ cells.

On the other hand, the analysis of cytokine producing Th cells allows us to evaluate the suppressive function of FOXP3⁺ populations, confirming the capability of the conventional CD25^{high}FOXP3⁺ Treg cells from healthy individuals to regulate CD4⁺ effector responses, mostly Th1 cells (IFN γ and TNF α producing cells). There is emerging evidence supporting that defective Treg function to modulate cytokine production was related to the development or worsening of lupus. In spite of the normal amount of CD25^{high}FOXP3⁺ cells, the data herein presented evidence on the impairment of Treg function in SLE, since the negative correlations between the number of Treg and IFN γ , TNF α or IL-10 secreting cells found in healthy subjects were disrupted in patients. Defects on Treg function have been reported in SLE patients after *in vitro* evaluation of the ability to suppress effector cells or cytokine production [2, 23, 24]; however this is the first study analysing *ex vivo* the relationship between Treg cells and cytokine producing Th cells.

Conversely, the absence of negative correlations between CD25^{-/low}FOXP3⁺ and cytokine producing cells in healthy individuals suggests that this population is not involved in the control of Th cell derived cytokines. Attempts to determine the functionality of CD25⁻FOXP3⁺ cells reached different conclusions [19, 25]. Since separation of this population is not possible, determination of their possible functional activity is not currently available. Given that CD127 expression is downregulated after activation, we believe, in accordance with other authors [19, 25], that results obtained

after isolating CD25⁻CD127^{-/low} cells may not be extrapolated. In essence, our results clearly showed that low expression of CD127 could not be used as a surrogate marker for FOXP3 to isolate putative CD25^{-/low} Treg cells, since the differences between percentages of FOXP3⁺ and CD127^{-/low} in the bulk of CD25⁻ and CD25^{low} populations were greatly discordant (Table 2).

Finally, this work provides interesting evidence supporting that CD25^{high} cells in SLE are functionally altered. We showed that CD25^{high} cells from active patients tend to secrete more IL-17 and, importantly, present a greatly decreased FOXP3⁺/IL-17⁺ ratio as compared to healthy individuals. In addition, the balance in the production of cytokines is also dysregulated in this subset, since the IL-17⁺/IFN γ ⁺ and IL-17⁺/TNF α ⁺ ratios were higher in active patients as compared to controls. All these data raise the possibility that CD25^{high} cells in SLE may display a tendency to be “Th17”, accordingly with the skew towards a Th17 response reported in SLE patients [26-29]. Although the mechanism underlying Treg “trans-differentiation” into Th17 cells is yet to be determined, the deficiency of TGF β and the increased levels of IL-6 found in patients, as well as the reduced Treg suppressive capacity, might explain it. In fact, IL-6, a Th17 inducer cytokine, has been shown to impair Treg activity [30, 31] and even convert Treg into cells able to produce IL-17 [32], whereas TGF β is related to the development and maintenance of Treg cells. TGF β levels seem to be critical to preserve Treg/Th17 balance, since high amounts promote Treg while low levels are necessary to Th17 differentiation [33]. If the conversion of Treg into Th17 cells actually occurs in lupus, it would explain the positive correlation found between the number of CD25^{high}FOXP3⁺ cells and serum levels of IL-17. So, although this relation may be surprising, it agrees

with our previous findings and several reports showing a considerable plasticity between Th17 and Treg cells [10-12, 31, 32].

5.- CONCLUSIONS

This work describes relevant phenotypic and functional features of FOXP3⁺ cells from SLE patients. The upregulation of CD25⁺FOXP3⁺ population, which is related to disease progression and CD4⁺ drop, suggests a possible autoregulatory mechanism to induce anergy or a selective T cell death of specific subsets. On the other hand, despite the normal frequency of CD25^{high} FOXP3⁺ cells found in SLE patients, its functionality seems to be impaired. Moreover, the increased proportion of IL-17⁺ cells among CD25^{high} population and the positive correlation between IL-17 levels and Treg cells suggest that Treg cells from SLE patients could be prone to develop into Th17 cells, being CD25^{high} IL-17⁺ cells an intermediate status of this “trans-differentiation”.

FUNDING

This work was supported by European Union FEDER funds, the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI080570) and the Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT, IB08-091). CP was supported by a fellowship from FIS (Ministerio de Ciencia e Innovación), BdP by FICYT (Consejería de Economía y Empleo) and JRC by a FPU grant (Ministerio de Educación).

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank ALAS (Asociación Lúpicos de Asturias) for its continuous encouragement.

REFERENCES

1. S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano et al., 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.* 155 (1995) 1151-1164
2. R. Gerli, G. Nocentini, A. Alunno et al., Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus, *Autoimmun. Rev.* 8 (2009) 426-430
3. J.D. Fontenot, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 330-336
4. J.H. Buckner, S.F. Ziegler, Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery, *Arthritis Res. Ther.* 6 (2004) 215-222
5. J. Wang, A. Ioan-Facsinay, E.I.H. van der Voort et al., Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells, *Eur. J. Immunol.* 37(2007) 129-138.
6. M. Bonelli, K. von Dalwigk, A. Savitskaya et al., Foxp3 expression in CD4⁺ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic

analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 67 (2008) 664-671

7. S. Lin, K. Chen, C. Lin et al., The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients, *Eur. J. Clin. Invest.* 37 (2007) 987-996
8. J. Suen, H. Li, Y. Jong et al., Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* 127 (2009) 196-205
9. B. Zhang, X. Zhang, F.L. Tang et al., Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 67 (2008) 1037-1040
10. H.J. Koenen, R.L. Smeets, P.M. Vink et al., Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells, *Blood* 112 (2008) 2340-2352
11. G. Beriou, C.M. Costantino, C.W. Ashley et al., IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function, *Blood* 113 (2009) 4240-4249
12. D. Valmori, C. Raffin, I. Raimbaud et al., Human ROR γ ^t TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3⁺Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (2010) 19402-19407

13. F. Annunziato, L. Cosmi, F. Liotta et al., The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation, *Int. Immunol.* 20 (2008) 1361–1368
14. B.M. Vanaudenaerde, W.A. Wuyts, L.J. Dupont et al., Interleukin-17 stimulates release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells in vitro: A potential role for interleukin-17 and airway smooth muscle cells in bronchiolitis obliterans syndrome, *J Heart Lung Transplant* 22 (2003) 1280-1283
15. M. El-Behi, B. Ciric, H. Dai et al., The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 568-575
16. L. Zhang, H. Yi, X.P. Xia et al., Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cell and immune tolerance, *Autoimmunity* 39 (2006) 269-276
17. P. López, L. Mozo, C. Gutiérrez et al., Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features, *Lupus* 12 (2003) 860-865
18. J. Gómez, A. Suárez, P. López et al. Systemic lupus erythematosus in Asturias, Spain: clinical and serologic features. *Medicine (Baltimore)* 85 (2006) 157-168

19. M. Bonelli, A. Savitskaya, C. Steiner et al., Phenotypic and functional analysis of CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ T cells in patients with systemic lupus erythematosus, *J. Immunol.* 182 (2009) 1689-1695
20. C. Prado, J. Gómez, P. López et al., Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity, *Immunobiology* 216 (2011) 386-392.
21. H. Wang, J. Xu, X. Ji et al., The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus, *Cell. Immunol.* 235 (2005) 117-121
22. H.M. Habib, T.E. Taher, D.A. Isenberg et al., Enhanced propensity of T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus to apoptosis in the presence of tumour necrosis factor alpha, *Scand. J. Rheumatol.* 38 (2009) 112-120
23. X. Valencia, C. Yarboro, G. Illei et al., Deficient CD4⁺CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus, *J. Immunol.* 178 (2007) 2579-2588
24. J. Gómez, C. Prado, P. López et al., Conserved anti-proliferative effect and poor inhibition of TNFalpha secretion by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Immunol.* 132 (2009) 385-392
25. H. Yang, W. Zhang, L. Zhao et al., Are CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ cells in untreated

- new-onset lupus patients regulatory T cells? *Arthritis Res. Ther.* 11 (2009) R153
26. X.Q. Chen, Y. Yu, H.H. Deng et al., Plasma IL-17A is increased in new-onset SLE patients and associated with disease activity, *J. Clin. Immunol.* 30 (2010) 221-225
27. K. Shah, W. Lee, S. Lee et al., Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R53
28. C. Prado, B. de Paz, J. Gómez et al., Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients, *Rheumatology (Oxford)* 50 (2011) 1794-1801
29. J. Yang, Y. Chu, X. Yang et al., Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 60 (2009) 1472-1483
30. S. Dominitzki, M.C. Fantini, C. Neufert et al., Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells, *J. Immunol.* 179 (2007) 2041-1045
31. S.G. Zheng, J. Wang, D.A. Horwitz, Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6, *J. Immunol.* 180 (2008) 7112-7116
32. L. Xu, I. Kitani, W. Fuss et al. Cutting edge: regulatory T cells induce

CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β , *J. Immunol.* 178 (2007) 6725-6729

33. E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao et al., Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature* 441 (2006) 235-238

FIGURE LEGENDS

Figure 1. FOXP3 and CD127 expression in CD25⁻, CD25^{low} and CD25^{high} CD4⁺ lymphocytes from SLE patients. Peripheral blood samples from healthy controls and SLE patients were analyzed by flow cytometry after staining for CD4, CD25, CD127 (extracellularly) and FOXP3 (intracellularly). **(A)** CD25⁻ cells were determined using the corresponding isotype control and CD25⁺ cells were divided into CD25^{low} and CD25^{high} according to shown regions. Representative dot plots from a healthy control and a lupus patient are shown. **(B)** Correlations between CD4⁺ lymphocytes and percentage of CD25⁻FOXP3⁺, CD25^{low}FOXP3⁺ and CD25⁻CD45RO⁺ cells. **(C)** Proportion of FOXP3⁺ cells up to CD25⁻, CD25^{low} and CD25^{high} populations from healthy controls and SLE patients classified according to disease duration. **(D)** SLEDAI score, anti-dsDNA titer and IFN α levels in patients with recent onset compared to those with longer evolution of the disease. HC: healthy controls; SLE: systemic lupus erythematosus patients. Bars represent median (IR).

Figure 2. Cytokine producing Th cells and their relationship with Treg cells. PBMC were stimulated with PMA (20 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) for 5 hours in the presence of monensin (2 μ M). Cells were stained extracellularly with CD4 APC and CD25 PE-Cy7 and intracellularly with IL-10 PE, TNF α PerCP-Cy5.5, IL-17 and IFN γ

PerCP-Cy5.5. Cytokine accumulation was measured by flow cytometry. **(A)** Representative dot plots from a healthy control and a lupus patient. **(B)** Correlations between CD25^{high}FOXP3⁺ and cytokine producing cells in HC and SLE patients. **(C)** IL-17⁺/FOXP3⁺, IL-17⁺/TNF α ⁺, IL17⁺/IFN γ ⁺ and IL-17⁺/IL-10⁺ ratios in CD25^{high} cells from HC and SLE patients classified according to disease activity (SLEDAI score ≥ 8 , n=16). Lines represent median. HC: healthy controls; SLE: systemic lupus erythematosus patients.

Figure 3. Associations between CD25^{high}FOXP3⁺ cells and Th17 related cytokines.

Cytokine levels were quantified in the serum of healthy controls and SLE patients and correlated with the percentage of CD25^{high}FOXP3⁺ Treg cells. **(A)** Association between TGF β serum levels and CD25^{high}FOXP3⁺ cells in healthy controls (HC) and SLE patients. **(B)** The number of CD25^{high}FOXP3⁺ cells from SLE patients correlated directly with IL-17 and IL-8 and inversely with IL-6 levels.

Table 1. Characteristics and disease parameters from SLE patients.

<i>Total SLE patients, n</i>	75
Women/men	72/3
Age at diagnosis (mean±SD), years	35.36 ±14.30
Disease duration (mean±SD), years	12.40 ±8.91
<i>Clinical manifestations, n (%)</i>	
Malar rash	40 (53.3)
Discoid lesions	10 (13.3)
Photosensitivity	45 (60.0)
Oral ulcers	34 (45.3)
Arthritis	56 (74.7)
Serositis	13 (17.3)
Renal disorder	26 (34.7)
Neurological disorder	7 (9.3)
Haematological disorder	51 (68.0)
Presence of anti-dsDNA	55 (73.3)
anti-dsDNA titer (mean±SD), U/ml	28.9 ±58.9
Presence of anti-ENA	36 (48.0)
Presence of anti-SSA	29 (38.6)
Presence of anti-SSB	14 (18.6)
Presence of anti-Sm	9 (12)
Presence of anti-RNP	13 (17.3)
<i>Treatment, n (%)</i>	
None or NSAIDs	12 (16.0)
Antimalarial drugs	54 (72.0)
Glucocorticoids	31 (41.3)
Dose (mean±SD), mg/day	7.56 ±4.74
Immunosuppressive drugs ^a	15 (20.0)

^aAzathioprine, cyclosporine A, mycophenolate mophetil or ciclophosphamide;
SLE: systemic lupus erythematosus; SD: standard deviation. NSAIDs: non
steroidal anti-inflammatory drugs.

Table 2. Size of CD4⁺ T cell subsets in healthy controls and SLE patients.

% out of CD4 ⁺ T cells	HC	SLE patients	p value
FOXP3 ⁺	6.41 (4.23)	10.22 (6.89)	0.001
FOXP3 ⁺ CD127 ^{-/low}	5.67 (3.23)	8.59 (6.77)	0.001
CD25 ^{high}	2.60 (2.99)	2.95(3.07)	0.191
CD25 ^{high} FOXP3 ⁺	1.47 (0.92)	1.65 (1.91)	0.333
CD25 ^{high} CD127 ^{-/low}	1.94 (1.35)	2.10 (2.43)	0.303
CD25 ^{high} CD45RO ⁺	1.62 (1.44)	0.90 (0.89)	0.039
CD25 ^{low}	13.69 (11.64)	19.06 (9.10)	0.002
CD25 ^{low} FOXP3 ⁺	2.19 (1.69)	3.42 (1.86)	0.0003
CD25 ^{low} CD127 ^{-/low}	5.18 (2.11)	6.14 (3.52)	0.019
CD25 ^{low} CD45RO ⁺	9.62 (7.61)	8.10 (6.77)	0.239
CD25 ⁻	83.39 (14.61)	77.72 (10.56)	0.003
CD25 ⁻ FOXP3 ⁺	3.13 (2.18)	6.71 (7.25)	0.00001
CD25 ⁻ CD127 ^{-/low}	23.86 (13.55)	25.62 (21.00)	0.876
CD25 ⁻ CD45RO ⁺	28.85 (15.37)	35.90 (18.10)	0.121

Data are shown as median (IR). Differences between patients and controls were evaluated using the Mann-Whitney U test. HC: healthy controls; SLE systemic lupus erythematosus

Figure 1

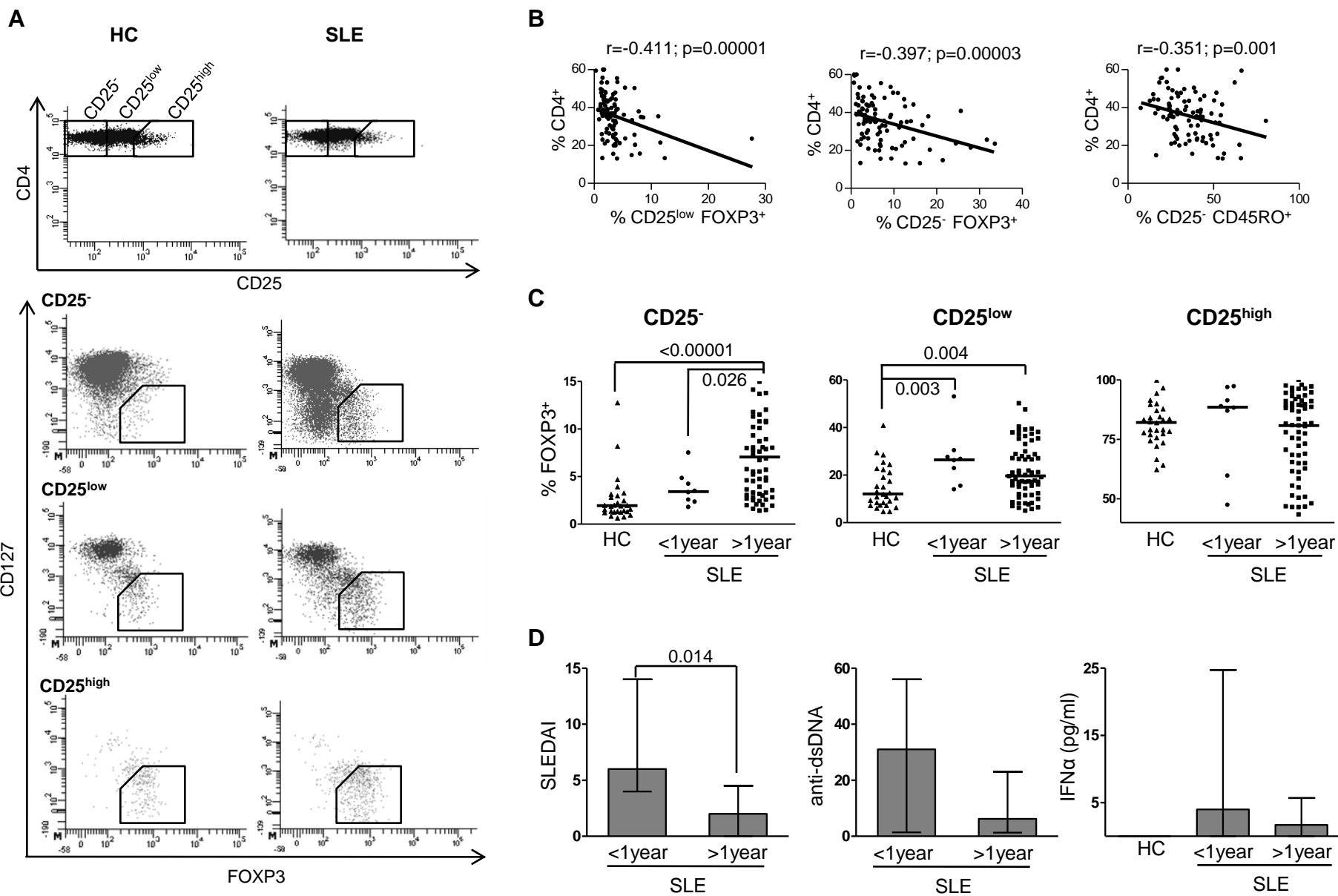


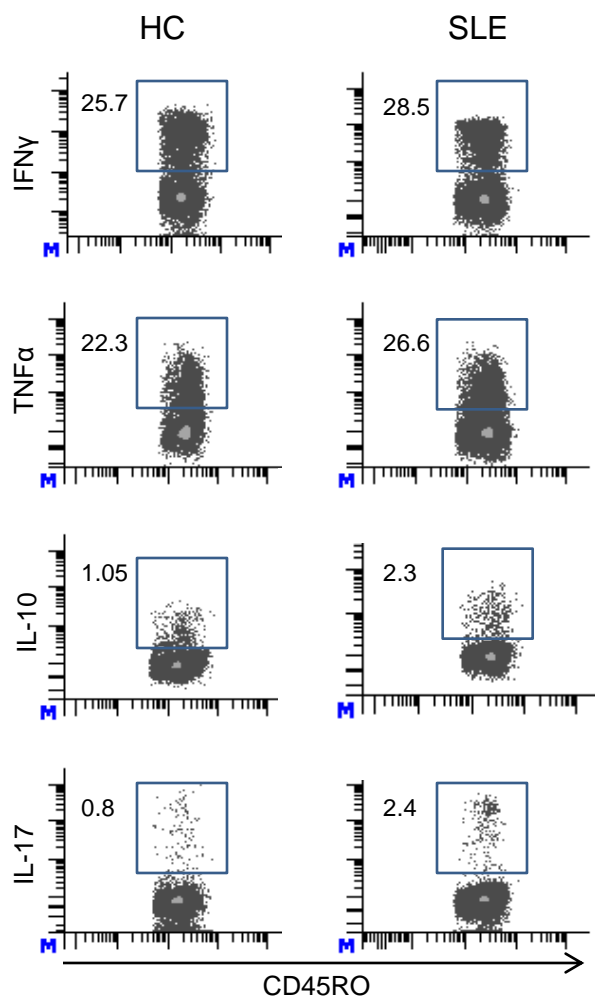
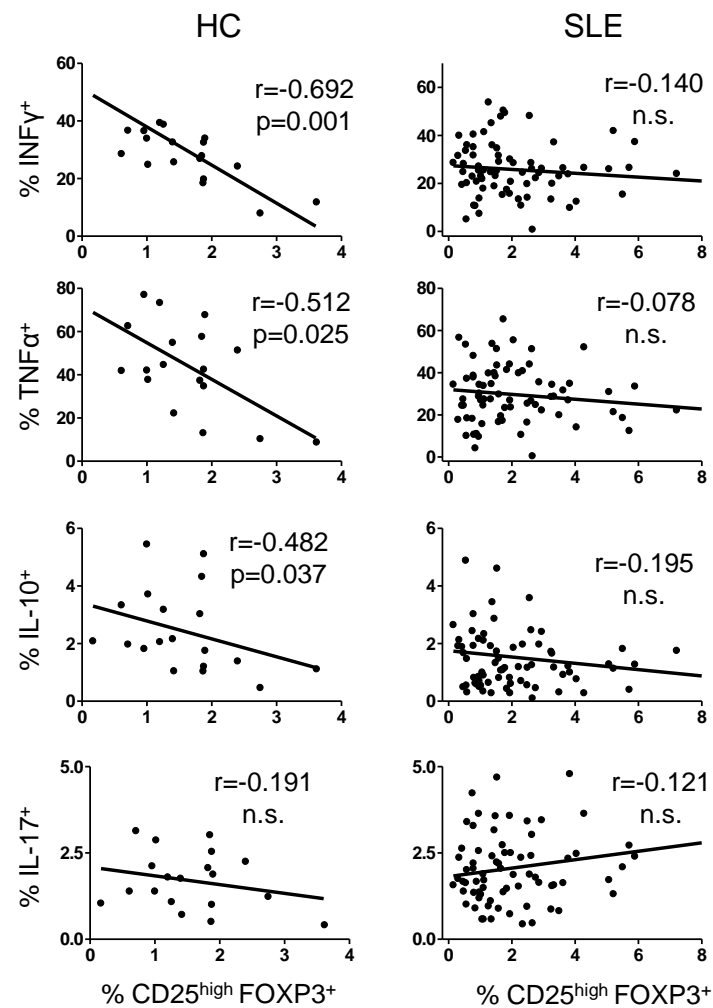
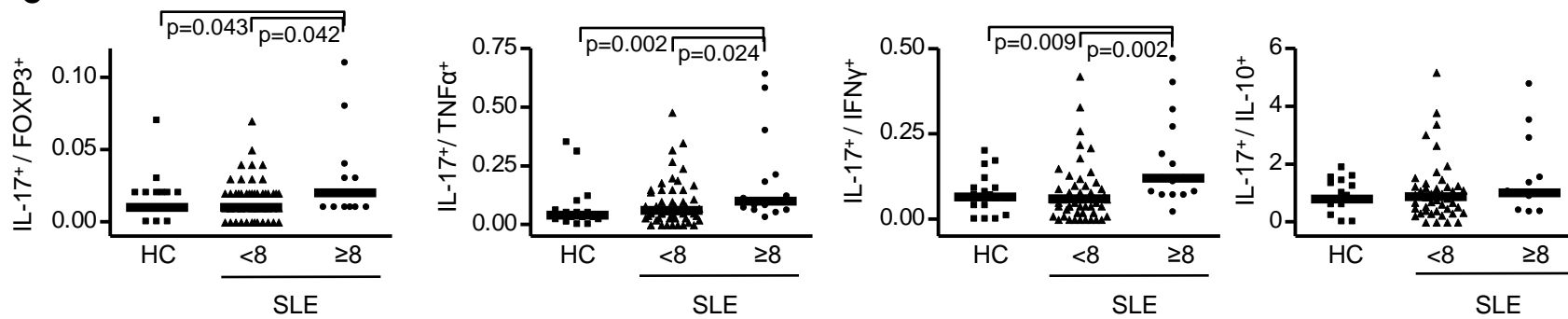
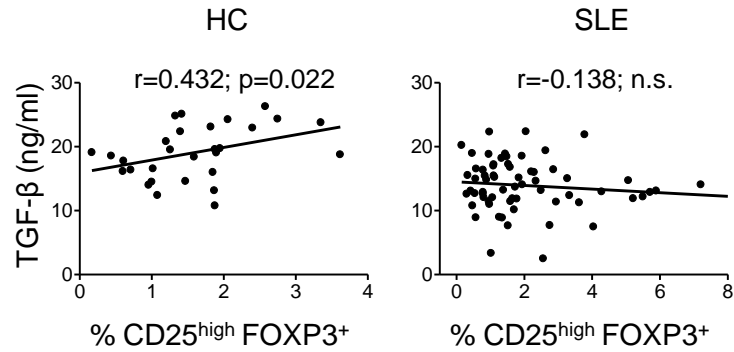
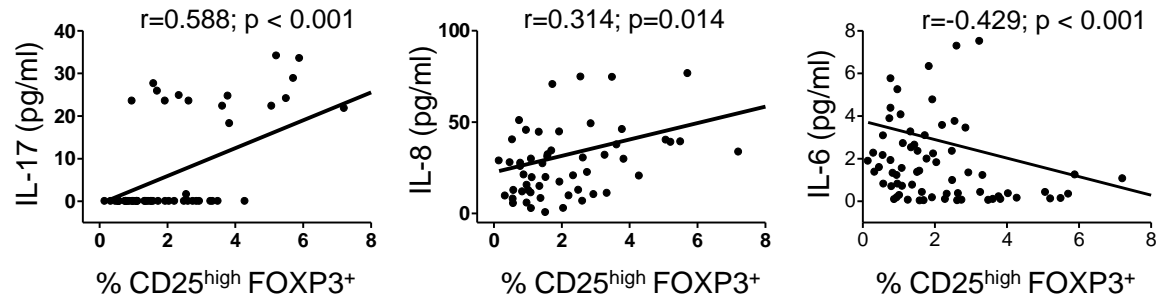
Figure 2**A****B****C**

Figure 3

A



B



ANEXO II

OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE LA TESIS

Rodríguez-Carrio J, Prado C, de Paz B, López P, Gómez J, Alperi-López M, Ballina-García FJ and Suárez A. Circulating endothelial cells and their progenitors in Systemic Lupus Erythematosus and early Rheumatoid Arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. Aceptado.

de paz B, Prado C, Alperi-López M, Ballina-García FJ, Rodríguez-Carrio J, López P, Suárez A. CD25-Foxp3+ cells in rheumatoid arthritis. Effect of glucocorticoid treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Mar 24. [Epub ahead of print].

de Paz B, Alperi-López M, Ballina-García FJ, Prado C, Gutiérrez C, Suárez A. Cytokines and regulatory T cells in rheumatoid arthritis and their relationship with response to corticosteroids. *J Rheumatol*. 2010 Dec; 37(12):2502-10.

de Paz B, Alperi-López M, Ballina-García FJ, Prado C, Mozo L, Gutiérrez C, Suárez A. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha genotypes in rheumatoid arthritis--association with clinical response to glucocorticoids. *J Rheumatol*. 2010 Mar;37(3):503-11.

Gómez J, Prado C, López P, Suárez A, Gutiérrez C. Conserved anti-proliferative effect and poor inhibition of TNFalpha secretion by regulatory CD4+CD25+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2009 Sep;132(3):385-92.

López P, Gómez J, Prado C, Gutiérrez C, Suárez A. Influence of functional interleukin 10/tumor necrosis factor-alpha polymorphisms on interferon-alpha, IL-10, and regulatory T cell population in patients with systemic lupus erythematosus receiving antimalarial treatment. *J Rheumatol*. 2008 Aug;35(8):1559-66.

