

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

HELENA LIMA DA SILVA NETA

**ESTUDO DE LINFÓCITOS T REGULADORES DE PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

RECIFE
2017

HELENA LIMA DA SILVA NETA

**ESTUDO DE LINFÓCITOS T REGULADORES DE PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Área de concentração Fármacos Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

**RECIFE
2017**

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso, CRB-4/ 1728

Silva Neta, Helena Lima da
Estudo de linfócitos T reguladores de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. /
Helena Lima da Silva Neta. – 2017.

107 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Maíra Galdino da Rocha Pitta
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologias. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica,
Recife, 2017.

Inclui referências, apêndice e anexos

1. Lupus eritematoso sistêmico 2. Linfócitos 3. Células-T I. Pitta, Maíra Galdino da Rocha (orientadora) II. Título.

616.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-662

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof^a. Dr^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Prof^a. Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

HELENA LIMA DA SILVA NETA

**ESTUDO DE LINFÓCITOS T REGULADORES DE PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Área de concentração Fármacos Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro / UFPE

Prof^a. Dr^a. Michelly Cristiny Pereira / UFPE

Prof^a. Dr^a. Claudia Diniz Lopes Marques / HOSPITAL DAS CLÍNICAS - HC-UFPE

Prof. Dr. Mardonny Bruno de Oliveira Chagas / UFPE

Prof^a. Dr^a Maira Galdino da Rocha Pitta / UFPE

AGRADECIMENTOS

À profa Suely Galdino (in memoriam) por ter me apresentado de maneira ímpar o programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica; por toda a dedicação que teve em edificar vidas e potencial inovador que ultrapassava os limites acadêmicos.

À profa Maira Galdino pela orientação e compreensão nos momentos cruciais desta longa caminhada. E pela oportunidade de me inserir no seu seletor grupo de pesquisa LINAT.

Aos professores Moacyr e Michelly por toda atenção e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Angela Luzia, ao Dr Henrique Mariz e toda a equipe de médicos reumatologistas e professores do Hospital das Clínicas da UFPE por toda atenção, dedicação e experiências trocadas.

A todos os pacientes e demais voluntários que contribuíram gentilmente com este estudo.

À profa Maria Carolina por toda dedicação, atenção e cuidado; por todos os momentos de discussão, tristezas e alegrias nas incontáveis horas dedicadas a imunofenotipagem.

A professora Valéria Rêgo por todo incentivo, apoio e conhecimentos passados.

À Audrey Romano por toda a parceria e ensinamentos transferidos com presteza.

A todos os professores que marcaram a minha caminhada e me incentivaram a prosseguir na carreira acadêmica: Luis Fernando, Tatiane Santi, Liana Clébia, Rossana Souto, Plínio Delatorre e Carlos Alberto.

À Wagner por toda a sua dedicação, atenção e disponibilidade durante o desenvolvimento dos experimentos de biologia molecular.

Aos membros da Banca Examinadora que aceitaram contribuir com nosso trabalho.

A todos os funcionários da UFPE que tive a oportunidade de conhecer. Em especial a Paulo por toda a atenção, eficiência, organização e simpatia.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo suporte técnico e financeiro.

A toda equipe do laboratório LINAT. Aos amigos, colegas e conhecidos por toda a parceria, aprendizagem, companheirismo, idas ao RU, lanches da tarde ou da noite, por todas as risadas ou berros da amada Flaviana, “Palestras” de Mardonny, caronas incluindo as lotadas e superlotadas, conversas científicas ou não...Vocês tornavam os dias mais leves.

Aos queridos amigos PPGITEANOS Thiago Rafael e Simone por toda amizade, companheirismo e por todos os nossos amáveis encontros.

Aos grandes amigos Vanessa, Flávia, João Paulo, Priscilla Anne, Thiago Hunney, Gisléa, Kalline, Samara, Bruna, Suhellen, André, Segundo, Érick, Guilherme, Lela, Hellane e Edson por estarem sempre por perto de uma maneira muito especial.

A todos as outras fortes amizades que surgiram ao longo da minha caminhada e a inesquecível turma de farmácia da UFPB.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta com o meu crescimento pessoal e profissional.

À toda a minha família que torceu imensamente pelas minhas conquistas e compreendeu todas as minhas ausências ao longo desta caminhada. E a família de Joel que se tornou parte da minha família.

Aos meus amados irmãos Thalita e Léo por toda a compreensão e incentivo nos momentos mais decisivos.

Ao meu namorado Joel por todo o seu amor, atenção, compreensão, paciência e espera para construção da nossa vida.

Aos meus amados pais Joana e João por todo amor dedicado a minha criação e a dos meus irmãos. E por terem nos ensinado que o impossível é algo distante daqueles que realmente creem!

À Maria Santíssima por todas as superações na realização deste trabalho.

A Deus, minha eterna fortaleza que permitiu a realização deste sonho!

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é o protótipo das doenças autoimunes sistêmicas. Desregulações na homeostase das células T reguladoras (Tregs) tem sido descritas no desenvolvimento do LES, contudo grande parte dos estudos que investigam estas células no contexto da doença apresentam dados contraditórios. Portanto, o presente estudo visa investigar as células Tregs de pacientes com LES frente as manifestações clínicas da doença. Foram incluídos neste estudo 115 pacientes (112 mulheres e 3 homens, com idade média de 36 ± 5.65 anos), sendo 86 com a doença em atividade (SLEDAI ≥ 6) e 29 em remissão (SLEDAI < 6). Todos os pacientes foram recrutados do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, Recife – PE, Brasil e preencheram os critérios de classificação do American College of Rheumatology para o LES. O grupo controle foi constituído por 32 mulheres e 1 homem, saudáveis, com idade média de 44 ± 1.41 anos. As concentrações séricas de citocinas relacionadas a via Treg (TGF- β , IL-10 e IL-35) foram determinadas através de kits específicos de ELISA e a imunofenotipagem foi realizada através da marcação específica com anticorpos fluorescentes para CD4, CD25, FOXP3, CD127. O estado de ativação das células Treg foi investigado através da expressão de CD45RA, FOXP3, CCR7 e CCR4. Dados não paramétricos foram analisados através do teste de *Mann-Whitney* e dados paramétricos através do *T test* ou *one-way ANOVA*. A regressão linear múltipla foi utilizada para análises adicionais, sendo considerado $P < 0,05$ significativo para todos os testes. Nossos resultados indicam uma liberação defeituosa de citocinas da via Treg no LES. Os níveis séricos de TGF- β foram significativamente menores em pacientes com LES (31,25; 31,25 - 1000 pg / mL) do que em voluntários saudáveis (60; 31,25 - 966 pg / mL) ($p = 0,001$). Por outro lado, os níveis de IL-35 foram maiores em pacientes (0,78; 0,78 a 185,6 pg / mL) do que em voluntários sadios (0,78; 0,78-2,94 pg / mL) ($p = 0,03$), e IL-10 não divergiu entre os grupos ($p > 0,05$). Foi observada uma significativa elevação na frequência das células Treg CD4⁺FOXP3⁺ ($p=0,003$) de pacientes com LES. Entretanto, diferente de todos os fenótipos ou citocinas relacionados a via Treg estudados, apenas as células eTreg (CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻) ($p=0,01$) foram inversamente correlacionadas a atividade da doença, enquanto que as células nonTreg (CD4⁺FOXP3^{Low}CD45RA⁺) ($p=0,003$) exerceram uma influência direta. Importaneamente o fenótipo nonTreg foi o indicador mais consistente de atividade do LES, confirmado pelo modelo de análise baseado na regressão linear multivariada. Em resumo nós sugerimos a padronização da amostra baseada no SLEDAI para aumentar a acurácia das futuras investigações conduzidas no LES e destacamos as células non Treg como um potencial biomarcador de atividade da doença.

Palavras-chave: Doença autoimune. Células T reguladoras. FOXP3. Biomarcador.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is the prototype of systemic autoimmune disorders. Deregulations in Treg cells homeostasis has been described in SLE development, however most studies investigating these cells in this context showed contradictory data. Thus, the present study aims to investigate the Treg cells of patients with SLE in relation to the disease clinical manifestations. Were included in this study 115 patients (112 women and 3 men, mean age of 36 ± 5.65 years), 86 with active disease (SLEDAI ≥ 6) and 29 in remission (SLEDAI < 6). All patients were recruited from Hospital das Clínicas of UFPE, Recife - PE, Brazil and met the criteria of the American College of Rheumatology for SLE. The control group consisted of 32 healthy women and 1 man with an average age of 44 ± 1.41 years. Treg related cytokines (TGF- β , IL-10 and IL-35) serum concentrations were determined by specific ELISA and immunophenotyping was performed by staining with fluorescent specific antibodies for CD4, CD25, FOXP3, CD127. CD4⁺FOXP3⁺ Treg cell activation state was investigated based on CD45RA, FOXP3, CCR7 and CCR4 expression. Nonparametric data analyzes were performed using the Mann-Whitney test while parametric data were t test or one-way ANOVA. Multiple linear regressions were used for further analysis, $P < 0.05$ was considered significant for all tests. Our results indicate a defective release of cytokines from the Treg pathway in SLE. TGF- β serum levels were significantly lower in SLE patients (31.25; 31.25 – 1000 pg/mL) than healthy volunteers (60; 31,25 - 966 pg/mL) ($p = 0.001$). On the other hand, IL-35 levels were higher in patients (0.78; 0.78- 185.6 pg/mL) than in healthy volunteers (0.78; 0.78- 27.94 pg/mL) ($p=0.03$) and IL-10 showed no significant differences between groups ($p>0.05$). There was a significant increase in CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells ($p = 0.003$) frequency of SLE patients. However, unlike all other Treg cells phenotypes analyzed or cytokine pattern, only eTreg (CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻) ($p=0,01$) subtype was inversely correlated with disease activity while nonTreg (CD4⁺FOXP3^{Low}CD45RA⁻) ($p=0,003$) exerted a direct influence. Importantly, nonTreg cells were the most consistent SLE active indicator, confirmed by the analysis model based on multivariate linear regression. In summary, our results suggest the use of sample standardization based in SLEDAI score to increase accuracy in further SLE investigations and highlights nonTreg cells as a new biomarker to promote search for effective therapeutic strategies in SLE.

Key-words: Autoimmune disease. Regulatory T cells. FoxP3. Biomarker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS EM PACIENTES COM LES.....	22
FIGURA 2 – POSSÍVEIS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTOIMUNES VISANDO O REESTABELECIMENTO DA HOMEOSTASE DE CÉLULAS TREGS.....	30
FIGURA 3 – DINÂMICA DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TCD4⁺ QUE EXPRESSAM FOXP3.....	33
FIGURA 4 – MECANISMOS PROPOSTOS PARA A SUPRESSÃO PERIFÉRICA EXERCIDA PELAS CÉLULAS TREGS.....	35
FIGURA 5 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO.....	38
FIGURA 6 – CYTOKINES SERUM LEVELS IN SLE PATIENTS (SLE) AND HEALTHY DONORS (ARTIGO 1).....	59
FIGURA 7 – NATURALLY OCCURRING TREG LYMPHOCYTES OF SLE PATIENTS AND HEALTHY INDIVIDUAL.....	85
FIGURA 8 – FOXP3⁺ TREGS SUBSET PHENOTYPING IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (SLE) AND HEALTHY DONORS (ARTIGO 2)....	87
FIGURA 9 – CCR7 (A) AND CCR4 (B) EXPRESSION IN NAÏVETREG, ETREG AND NONTREG OF SLE PATIENTS (ARTIGO 2).....	89

LISTA DE QUADROS

**QUADRO 1 – CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO LES PROPOSTOS PELO
AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (ACR)..... 22**

**QUADRO 2 – PAINÉIS DE ANTICORPOS UTILIZADOS PARA IMUNOFENOTIPAGEM
DAS CÉLULAS TREGS.....42**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PATIENTS CLINICAL AND DEMOGRAPHIC DATA (ARTIGO 1)	58
TABELA 2 - CLINICAL PARAMETERS INFLUENCE ON TGF-B AND IL-35 SERUM LEVELS OF SLE PATIENTS (ARTIGO 1)	60
TABELA 3 - CLINICAL AND DEMOGRAPHIC PARAMETERS OF SLE PATIENTS (ARTIGO 2)	83
TABELA 4 – INFLUENCE OF THE CLINICAL PARAMETERS IN SLEDAI SCORE FOR SAMPLE (ARTIGO 2).....	84
TABELA 5 – CLINICAL PARAMETERS INFLUENCE IN ETREG CELLS FREQUENCIES OF SLE PATIENTS (ARTIGO 2).....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
CD	Cluster de diferenciação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
eTreg	Células T reguladoras efetoras
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon-gama
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
naïveTreg	Células T reguladoras imaturas
nonTreg	Células não T reguladoras
NK	Células exterminadoras naturais
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pTreg	Células Tregulatórias de origem periférica
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
TA	Temperatura ambiente
Thelper	Linfócito T auxiliar
tTreg	Células Treguladoras de origem tímica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 LÚPUS ERITEMATOSO	19
3.2 EPIDEMIOLOGIA	20
3.3 ASPECTOS CLÍNICOS DO LES	21
3.4 RESPOSTA IMUNE RELACIONADA A PATOGÊNESE DO LES	24
3.5 TRATAMENTO DO LES	27
3.6 CÉLULAS T REGULADORAS (TREGS)	30
4 METODOLOGIA.....	38
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.2 PACIENTES E VOLUNTÁRIOS SADIOS	38
4.3 PARÂMETROS LABORATORIAIS	39
4.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS).....	40
4.5 DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS CELULARES DE CÉLULAS TREGS.....	40
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 ARTIGO 1	43
5.2 ARTIGO 2	61
6 CONCLUSÃO	90
7 PERSPECTIVAS	91
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE – SUPPLEMENTAL MATERIAL (ARTIGO 2).....	102
ANEXO – SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX – SLEDAI.....	105

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é considerado o protótipo das doenças autoimunes sistêmicas. Além de ser uma doença cuja etiopatogenia permanece pouco compreendida, ela se destaca por acometer múltiplos órgãos e sistemas, com manifestações clínicas imprevisíveis, fenótipo multifacetado e elevado potencial mórbido (ANDRADE, 2009; TSOKOS, 2011; MOHAN; PUTTERMAN, 2015). Tais características elegem o LES como uma das enfermidades de mais difícil condução clínica; estando entre as principais discussões a dificuldade de se compreender a definição dos estados de atividade e quiescência da doença (ANDRADE, 2009; STHOEGER, 2014).

Diversos medicamentos são utilizados na terapêutica do LES, tais como cloroquina, talidomida, antiinflamatórios não-esteróides e os corticosteroides; ou ainda, medicamentos utilizados no tratamento do câncer como a azatioprina e a ciclofosfamida (CARVALHO et al., 2014; STHOEGER et al., 2014). Contudo, a utilização destes medicamentos por longos períodos está relacionada a sérios efeitos colaterais, reações adversas e perda de eficácia do fármaco (TSUJIMURA, 2012; PICCHIANTI-DIAMANTI et al., 2014; BAZSÒ et al., 2015).

Consideráveis avanços na terapêutica do LES derivam de estudos que promovem uma melhor compreensão acerca dos mecanismos da doença (STHOEGER, 2014). Atualmente sabe-se que a patogenia do LES envolve funções aberrantes de diferentes tipos celulares que promovem o processo inflamatório; incluindo desregulações na liberação de citocinas, quimiocinas e demais mediadores da inflamação (PATHAK; MOHAN, 2011; SQUATRITO, et al., 2014; MOHAN; PUTTERMAN, 2015).

Visando novas estratégias terapêuticas, diversas alterações relacionadas a resposta imune no LES vem sendo investigadas. Em destaque neste cenário estão os estudos acerca das células T reguladoras (Tregs) em um importante eixo do desenvolvimento da doença (CHAVELE; EHRENSTEIN, 2011; MIYARA, et al., 2014).

Mutações no gene FOXP3 (crucial para o desenvolvimento de células Tregs) acarretam quadros de autoimunidade severa que podem levar o paciente a óbito (WILDIN et al., 2002; VLIET; NIEUWENHUIS, 2007). Além disso, a depleção de células Treg em murinos desencadeia rapidamente quadros inflamatórios e reações autoimunes que afetam múltiplos órgãos (KIM et al., 2007).

Compreende-se que o desenvolvimento do LES está associado a defeitos no controle homeostático das células T regs (MIYARA, et al. 2009; OHL; TENBROCK, 2015). Entretanto, análises de características fenotípicas e funcionais destas células provenientes de pacientes com LES acumulam uma série de dados divergentes. Alguns estudos demonstram habilidade supressora deficiente (LEE, et al., 2008; YAN, et al., 2008), outros não confirmam estes dados (ZHANG et al., 2008; BONELLI, et. al., 2008) ou refletem a grande variabilidade das subpopulações estudadas (XIUJUN PAN, et al., 2012, MIYARA, et al., 2005; ALVARADO-SANCHEZ, et al., 2006).

Portanto, o presente estudo visa a investigação do perfil Treg no LES e sua associação às manifestações clínicas da doença. Neste trabalho, nós apresentamos uma revisão de literatura sobre o LES e as células Tregs, seguidos de objetivos e metodologias utilizadas. Os resultados parciais e

respectiva discussão estão apresentados no formato de 2 artigos. O primeiro artigo avalia os níveis séricos das citocinas relacionadas ao perfil Treg em um grupo de 115 pacientes com LES em relação às manifestações clínicas da doença e aos parâmetros laboratoriais. No segundo artigo foram estudados os subtipos de células Treg em 30 pacientes com LES. Neste artigo foi proposta a quantificação da relevância relativa das variáveis clínicas e laboratoriais da amostra de pacientes, na perspectiva de gerar uma análise padronizada da amostra frente aos achados experimentais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os linfócitos T reguladores e suas citocinas em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-  Avaliar a expressão sérica de citocinas relacionadas à via Treg
-  Caracterizar as células Treg e suas subpopulações
-  Avaliar o padrão de migração tecidual dos subtipos de células Treg
-  Correlacionar todos os resultados obtidos aos parâmetros clínicos dos pacientes estudados
-  Promover uma melhor compreensão da doença com base nos resultados encontrados

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LUPUS ERITEMATOSO

O Lúpus Eritematoso (LE) é uma doença reumática de natureza auto-imune marcada pela presença de linfócitos T e B hiper-reativos, elevada produção de auto-anticorpos, exacerbada ativação do sistema complemento e deposição de imunocomplexos em diferentes tecidos e órgãos, mediante vários mecanismos que acarretam a perda da autotolerância (TSOKOS, 2011; WU et al., 2014; MAK; KOW, 2015). É reconhecida como o protótipo das desordens autoimunes multissistêmicas; contemplando um amplo espectro de apresentações clínicas com quadros inflamatórios que podem cursar de maneira localizada ou disseminada por todo o organismo (TSOKOS, 2011).

De maneira geral, pode ser classificado como cutâneo ou sistêmico. O lúpus eritematoso cutâneo (LEC) distingue-se pelas manifestações exclusivamente cutâneas, cujos sintomas gerais estão ausentes; ao passo que no lúpus eritematoso sistêmico (LES) ocorre o comprometimento de outros órgãos e sistemas tais como coração, pulmão, rins e cérebro, com possibilidade de envolvimento da pele (BERBERT; MANTESE, 2005; BERTSIAS et al., 2012).

De etiopatogenia pouco esclarecida, evidencia-se que o LES seja desencadeado por um conjunto de fatores de natureza genética, epigenética, ambiental e hormonal associados a desregulações do sistema imune e perda da autotolerância (DANCHENKO et al., 2006; RAHMAN; ISENBERG, 2008; TSOKOS, 2011; TSOKOS, et al., 2016). Desta forma, observa-se uma maior concordância da doença em gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos (BLOCK et al., 1975; DEAPEN et al., 1992; SQUATRITO, et al., 2014). Além disso, a exposição à radiação UV, infecções virais, ou ainda o uso prolongado

de estrógenos aumentam a predisposição a doença (LISNEVSKAIA et al., 2014; SQUATRITO, et al., 2014).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

O LES pode acometer pessoas de todas as idades, etnias e sexo. Por estar associado a fatores hormonais, observa-se maior frequência entre mulheres em idade fértil, com proporção de cerca de dez mulheres para cada homem afetado. As incidências globais da forma sistêmica e cutânea do LE são semelhantes, porém a forma cutânea é três vezes mais comum nos homens. A incidência desta doença triplicou nos últimos 40 anos, principalmente devido aos avanços no diagnóstico, que atualmente permitem identificar os casos mais brandos, outrora subdiagnosticados (BORCHERS et al., 2010; BERTSIAS et al., 2012; JARUKITSOPA et. al., 2015).

Nos Estados Unidos os índices de prevalência do LES superaram 51 por 100.000 pessoas. A incidência estimada para América do Norte, América do Sul e Europa varia de 2 a 8 por 100.000 habitantes por ano. A doença é mais comum nas zonas urbanas, e, fatores como diferentes etnias e condições geográficas também interferem na prevalência, severidade e frequência das manifestações clínicas (BORCHERS et al., 2010; BERTSIAS et al., 2012; BORBA et al., 2013; JARUKITSOPA et. al., 2015).

Existe uma maior tendência ao acometimento do LES na sua forma cutânea em países tropicais, incluindo o Brasil, cuja incidência de raios ultravioletas é mais elevada. Entretanto, mensurações de incidência ou prevalência do LES no Brasil ainda não são muito consistentes, especialmente em virtude do pequeno número de pacientes envolvidos nos estudos

disponíveis. Contudo, estima-se uma taxa de 11,3 mulheres para cada homem afetado pela doença, o que está dentro do esperado frente às proporções mundiais (BORBA et al., 2013).

3.3 ASPECTOS CLÍNICOS DO LES

As manifestações clínicas do LES, além de muito heterogêneas, cursam com episódios intercalados de intensa atividade inflamatória e remissão. A nefrite é a principal complicação da doença. Ela afeta cerca de 40 a 70% dos pacientes e causa um elevado grau de morbidade e mortalidade. Dentre os sintomas mais frequentes estão as lesões cutâneas eritematosas, geralmente na região malar e dorso do nariz (o que configura o eritema malar – lesão típica de elevada prevalência) (Figura 1A). Também se destacam dor e inchaço, principalmente nas articulações das mãos, além de inflamação de pleura ou pericárdio (CERVERA et al., 2003; TURCHETTI et al., 2012; MEROLA et al., 2014; MOHAN; PUTTERMAN, 2015).

Alterações hematológicas são bastante frequentes no LES, e incluem a anemia, leucopenia, linfopenia e plaquetopenia. Nos casos mais severos, pode ocorrer encefalite, acarretando convulsões, alterações de comportamento ou do nível de consciência e psicoses. Outros sintomas são as vasculites, as quais podem causar eritemas dolorosos disseminados ou localizados na região palatina, palmar das mãos, plantar dos pés, ou em membros (Figura 1B) (BERBERT; MANTESE, 2005; TURCHETTI et al., 2012; CRAMPTON, et al., 2014; MOHAN; PUTTERMAN, 2015).

Figura 1 – Manifestações cutâneas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Eritema malar (A); púrpura palpável (B).



Fonte: *Lupus Image Bank*, ELSEVIER.

Na prática clínica o LES é diagnosticado com o auxílio dos critérios de classificação propostos pelo *American College of Rheumatology (ACR)*. Desta forma, a doença pode ser identificada em pacientes que apresentem pelo menos 04 dos 11 critérios clínicos e imunológicos indicados no quadro 01 (TAN et al., 1982; HOCHBERG, 1997).

Quadro 01 - Critérios para o diagnóstico do LES propostos pelo *American College of Rheumatology (ACR)*.

1. Eritema malar	lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
2. Lesão discoide	lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3. Fotossensibilidade	exantema cutâneo, como reação não usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou conforme observado pelo médico.
4. Úlceras orais/nasais	úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores,

	observadas pelo médico.
5. Artrite	artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
6. Serosite	pleuritis (caracterizada por história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).
7. Comprometimento renal	proteinúria persistente ($> 0,5$ g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
8. Alterações neurológicas	convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).
9. Alterações hematológicas	anemia hemolítica ou leucopenia (menor que 4.000 leucócitos/ml em duas ou mais ocasiões), linfopenia (menor que 1.500 linfócitos/ml em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000 plaquetas/ml na ausência de outra causa).
10. Alterações imunológicas	anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm, ou presença de anticorpo antifosfolípide baseado em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico ou teste falso positivo para sífilis, por no mínimo seis meses.
11. Anticorpos antinucleares	título anormal de anticorpo anti-nuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

O principal índice utilizado para estimar a atividade do LES é o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) (Anexo). Ele foi desenvolvido por reumatologistas no ano de 1985, com notável aplicabilidade clínica e científica. O SLEDAI é formado por 24 itens que constituem sinais, sintomas e testes laboratoriais referentes ao LES que recebem uma pontuação individual, variando de 1 a 8, de acordo com a gravidade do item para a evolução da doença. Desta forma, quanto maior o valor da pontuação obtida,

maior será a atividade da doença; uma vez que o somatório final do peso de cada item reflete a severidade do quadro clínico do paciente (GLADMAN et al., 2002; BORBA et al., 2008; YEE et al., 2011).

3.4 RESPOSTA IMUNE RELACIONADA Á PATOGÊNESE DO LES

Evidencia-se que nos estágios iniciais do LES, as células apresentadoras de antígeno (APCs), através da estimulação antigênica (autoantígenos), ativam as células T e produzem mediadores inflamatórios tais como o fator de ativação de linfócitos B (BAFF). Isto resulta na ativação da resposta imune adaptativa com diferenciação de linfócitos T efetores e exacerbada produção de autoanticorpos. Esta resposta é amplificada através da depuração defeituosa de debris apoptóticos e componentes plasmáticos que são reconhecidos pelos autoanticorpos promovendo a formação de imunocomplexos circulantes. Estes imunocomplexos por sua vez, estimulam células dendríticas, basófilos, neutrófilos, macrófagos/monócitos à liberação de diversos fatores pró-inflamatórios tais como as citocinas IL-6, IL-1 β , IL-4, IL-18, TNF- α , IFN tipo I e BAFF. Assim, ocorre uma amplificação da ativação de linfócitos T e B autorreativos, em um *feedback* positivo para a inflamação crônica e dano tecidual (PATHAK; MOHAN, 2011; MOHAN; PUTTERMAN, 2015).

Pacientes com LES apresentam capacidade reduzida no controle epigenético da expressão gênica. A hipometilação do DNA de diversos genes conduz a superexpressão de proteínas inflamatórias tais como IFNs, CD40L, CD70; bem como está relacionada a desregulação da resposta imune com alterações na composição e função das populações de linfócitos TCD4⁺ (WEN, et al., 2007; ZHAO, et al. 2010; DEVIN, et al., 2013).

Durante o processo normal de apoptose, antígenos próprios são expostos transitoriamente para o meio extracelular e rapidamente são internalizados por fagócitos. Contudo, no LES observam-se tanto falhas nos mecanismos de depuração celular quanto uma maior propensão a apoptose; isto promove a exposição persistente de autoantígenos que são reconhecidos por receptores TRLs das células apresentadoras de antígenos (APCs). Em meio pró-inflamatório, receptores TRL7 e TRL9 reconhecem antígenos contendo segmentos de RNA e DNA, respectivamente, e estimulam a produção de IFN tipo I e outras citocinas que favorecem o processo inflamatório (SQUATRITO, et al., 2014).

A partir da liberação de NETs (*neutrophil extracellular traps*), os neutrófilos também atuam como fonte de antígenos contendo ácidos nucleicos e peptídeos. Desta forma, as células apoptóticas e os neutrófilos fornecem os ligantes críticos para a produção de interferons do tipo I e estão no topo da cascata do mecanismo patogênico da doença (GUPTA; KAPLAN, 2016; TSOKOS, et al., 2016).

A apresentação antigênica por moléculas do MHC inicia a ativação de linfócitos TCD4⁺ que induzem a mudança de classe, afinidade, maturação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos com elevada secreção de autoanticorpos (isotipo IgG). Estes autoanticorpos formam imunocomplexos e aderem a proteínas do sistema complemento ou a receptores Fcγ presentes em vários tipos celulares. Isto poderia justificar o dano tecidual disseminado pelo organismo através do recrutamento das células inflamatórias (CRAMPTON, et al., 2014; ESMAEILI, et al., 2016)

A resposta imune mediada por linfócitos TCD4⁺ é classicamente dividida em Th1 e Th2 que se distinguem pelo perfil de citocinas secretadas e função. Contudo, novas vias tais como Th17, Th22 e Th9 vêm sendo estudadas na etiopatogenia do LES, e, anormalidades na homeostase de diversas citocinas foram descritas, tais como secreção alterada de IL-2, IL-4, IL-9, IL-10, IL-15, IL-17, IL-22, IL-23, e IFN tipo I (SOKRATIS et al., 2011; OUYANG, et al., 2013; LIN, et al., 2014; TALAAT et al., 2015). Principalmente nos pacientes com a doença em atividade observa-se uma distribuição dos linfócitos T desequilibrada, sendo mais prevalente o perfil pró-inflamatório caracterizado por citocinas e linfócitos das vias Th1 e Th17 (NALBANDIAN, et al., 2009; ESMAEILI, et al., 2016).

Alterações na homeostase das citocinas têm sido apontadas como fortes indicadores das disfunções relacionadas ao LES. Isto porque as citocinas são moléculas protéicas secretadas tanto por células da imunidade inata quanto da adaptativa que regem a resposta imune. Cada uma destas moléculas pode tanto gerar efeitos pleiotrópicos quanto atuar em conjunto na convergência de uma mesma ação. Desta forma, elas podem promover a estimulação da resposta imune induzindo a proliferação, ativação e quimiotaxia de diferentes fenótipos celulares; ou provocar a supressão ao mediar ações antagônicas a estimulação. Tais características projetam estas moléculas como importantes biomarcadores do LES (RONNBLOM; ELKON, 2010; SOKRATIS et al., 2011; TALAAT et al., 2015; STYPIŃSKA; PARADOWSKA-GORYCKA, 2015).

Além das modificações na homeostase das citocinas, uma das características mais marcantes do LES é a produção de autoanticorpos, o que a caracteriza como uma doença dirigida por linfócitos B. Contudo, os linfócitos T

são reconhecidos como elementos fundamentais neste cenário, uma vez que promovem o estímulo necessário para a diferenciação, proliferação e maturação dos linfócitos B, exercendo papel crucial para a expressão dos autoanticorpos que caracterizam a doença (SHLOMCHIK et al., 2001 ; MAK; KOW, 2015).

A secreção de IL-6, IFN- γ , IL-17, IL-23, bem como a atuação das células dendríticas e T reguladoras são consideradas determinantes para o estado tolerogênico (ESMAEILI, et al., 2016). Contudo, a possibilidade de escape de células potencialmente autorreativas do timo, torna o controle periférico exercido pelos linfócitos Treg uma ferramenta de fundamental importância para a manutenção da autotolerância e prevenção de doenças autoimunes. Isto pode ser denotado nos experimentos com modelos animais, cuja depleção de células Treg promove quadros inflamatórios típicos de doenças autoimunes severas; os quais podem ser revertidos mediante reposição destas células por transferência adotiva (SAKAGUCHI, 2004; CHAVELE, 2011; HADASCHIK et al., 2015).

3.5 TRATAMENTO DO LES

Na prática clínica o tratamento do LES varia de acordo com as manifestações da doença, podendo ser prescritos anti-inflamatórios não esteroides e corticosteroides; drogas modificadoras do curso da doença (DMCDs) e imunossupressoras tais como hidroxicloroquina, talidomida, azatioprina e ciclofosfamida (XIONG; LAHITA, 2014; CARVALHO et al., 2014). No entanto, a exposição por longos períodos a estes fármacos pode promover sérios efeitos colaterais, reações adversas e ausência de resposta a droga. Isto reduz as chances de controle da doença e aumenta o risco de morte

(TSUJIMURA et al., 2012; PICCHIANTI-DIAMANTI et al., 2014; CARVALHO, et al., 2014; STHOEGER et al., 2014; BAZSÒ et al., 2015).

Como alternativas terapêuticas para o LES, surgiram os medicamentos biológicos que começaram a ser desenvolvidos com o aumento da compreensão dos mecanismos relacionados à doença (STHOEGER et al., 2014). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os medicamentos biológicos englobam moléculas complexas obtidas a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal ou procedimentos biotecnológicos (ANVISA, 2015).

Diversos agentes biológicos estão sendo estudados, dentre os quais se enquadram rituximabe (anti-CD20, direcionado para linfócitos B), tabalumabe (contra estimulador de linfócito B), abatacepte (CTLA-4Ig, inibidor de ativação de linfócitos T) e tocilizumabe (anti-receptor de IL-6, inibidor de citocinas). Desta série, a primeira droga aprovada pelo FDA para o tratamento do LES foi o belimumabe (anti-BLyS mAb), um anticorpo monoclonal que inibe o estimulador de linfócitos B chamado de BLyS (STHOEGER et al., 2014).

Dentre os agentes biológicos estudados, os mais promissores integram a terapia antígeno-específica com peptídeos tolerogênicos. Esta terapia é mais específica do que os tratamentos convencionais que promovem a imunossupressão de grande parte do sistema imunológico; ou dos agentes biológicos direcionados para células e moléculas relacionadas de maneira não específica à patogênese do LES (STHOEGER et al., 2014).

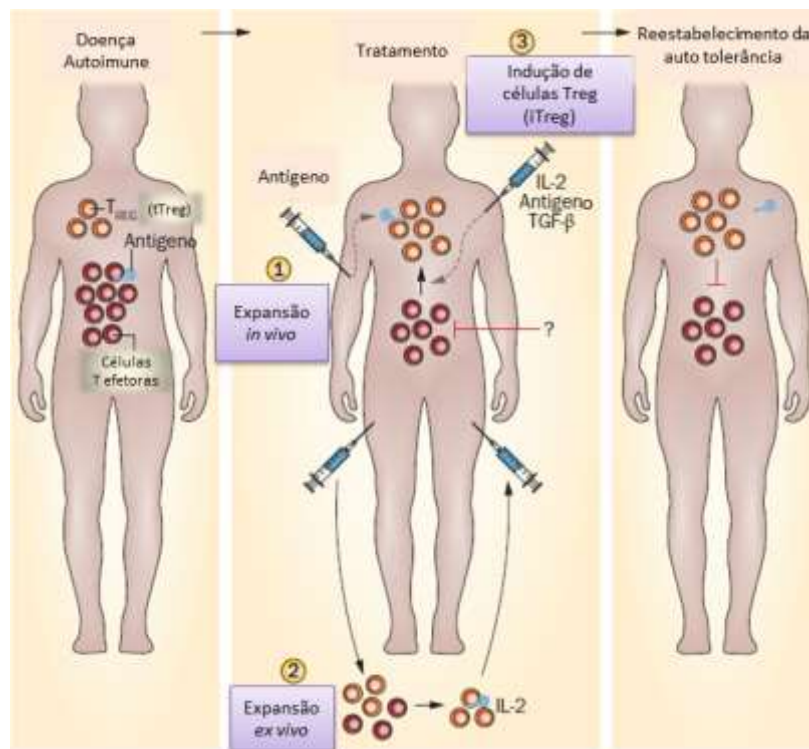
A perda da auto-tolerância é a principal característica do LES (STHOEGER et al., 2014; KLATZMANN; ABBAS, 2015). Neste sentido, a terapia antígeno-específica visa reestabelecer a auto tolerância através da regulação de

pequenas populações celulares fundamentais para a patogênese da doença. Peptídeos tolerogênicos específicos para o LES tais como o P140 e o hCDR1 vêm apresentando promissora capacidade de remissão da doença e indução do fenótipo de células Tregs para o reestabelecimento da auto-tolerância, sem comprometer o desempenho do sistema imune (STHOEGER et al., 2014)

Além da busca de medicamentos biológicos com mecanismos de ação centrados na indução do fenótipo T regulador (STHOEGER et al., 2014); outras estratégias terapêuticas visando o reestabelecimento das populações de células Treg e controle das reações autoimunes vêm sendo discutidas. Dentre elas se enquadram a expansão de células Treg *in vivo* mediante estimulação antigênica, expansão de células Treg *ex vivo* para subsequente administração no paciente e indução do fenótipo Treg em células T convencionais *in vivo* (iTreg) (Figura 2) (MIYARA et al. 2014).

Diferentes estudos clínicos conduzidos com pacientes lúpicos também buscam o reestabelecimento da homeostasia das células Tregs a partir da administração de reduzidas doses de IL-2. Essa citocina é fundamental para a ativação, sobrevivência, função das células Treg, e, sua administração vem sendo relacionada à recuperação da homeostase destas células, remissão da inflamação e da reposta autoimune (MIYARA et al. 2014; KLATZMANN; ABBAS, 2015; SPEE-MAYER, et al. 2016).

Figura 2 – Possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças autoimunes visando o reestabelecimento da homeostase de células Tregs. Expansão *in vivo* das células Tregs (1); Expansão *ex vivo* das células Tregs (2); Indução de células Treg *in vivo* (iTregs) (3).



Fonte: Adaptado de MIYARA et al., 2014.

3.6 CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs)

A relevância da atuação das células Tregs em humanos é principalmente pronunciada pelo quadro de inflamação severa e autoimunidade que pode ser observado nos portadores de poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked* ou IPEX). Esta síndrome é desencadeada por mutações no gene FOXP3 que é decisivo para o desenvolvimento das células Tregs no timo. Pacientes com IPEX apresentam uma ampla variedade de autoanticorpos, diabetes insulino-dependente, eczema, anemia hemolítica, tiroidite, doença inflamatória intestinal (IBD) e são dependentes de transplante de medula óssea para sobreviver (WILDIN et al., 2002; VLIET; NIEUWENHUIS, 2007).

O fator de transcrição FOXP3 é crucial para a ativação, desempenho das funções e manutenção das células Tregs. Ele é expresso de maneira constitutiva nas células Tregs naturais, mas também pode ser induzido em linfócitos T efetores ativados recentemente (WALKER et al., 2003; TRAN et al., 2007; WANG et al., 2007).

As células Tregs de humanos encontram-se na forma de diferentes subtipos os quais podem ou não apresentar atividade supressora. De maneira geral, os subtipos destas células são organizados em dois grandes grupos; sendo o primeiro constituído pelas células Tregs naturais (nTregs ou tTregs) de origem tímica e o segundo constituído pelas células Tregs induzidas ou adaptativas que podem surgir a partir de células T convencionais na periferia (pTregs) (SAKAGUCHI et al., 2010, SUEN; CHIANG, 2012; MIYARA et al., 2014; NIE et al., 2015).

Existem vários subtipos de células com capacidade supressora já identificados, dentre os quais podem ser citados os das células T gama-delta, T auxiliares 3 (Th3) e T reguladoras do tipo 1 (Tr1) que constituem as células Tregs adaptativas ou induzidas (geradas na periferia por estímulos antigênicos diversos ou circunstâncias tolerogênicas). Elas normalmente atuam através da liberação de citocinas potencialmente anti-inflamatórias como IL-10 e TGF β (JONULEIT; SCHMITT, 2003; SAKAGUCHI et al., 2010; GREGORI et al., 2012).

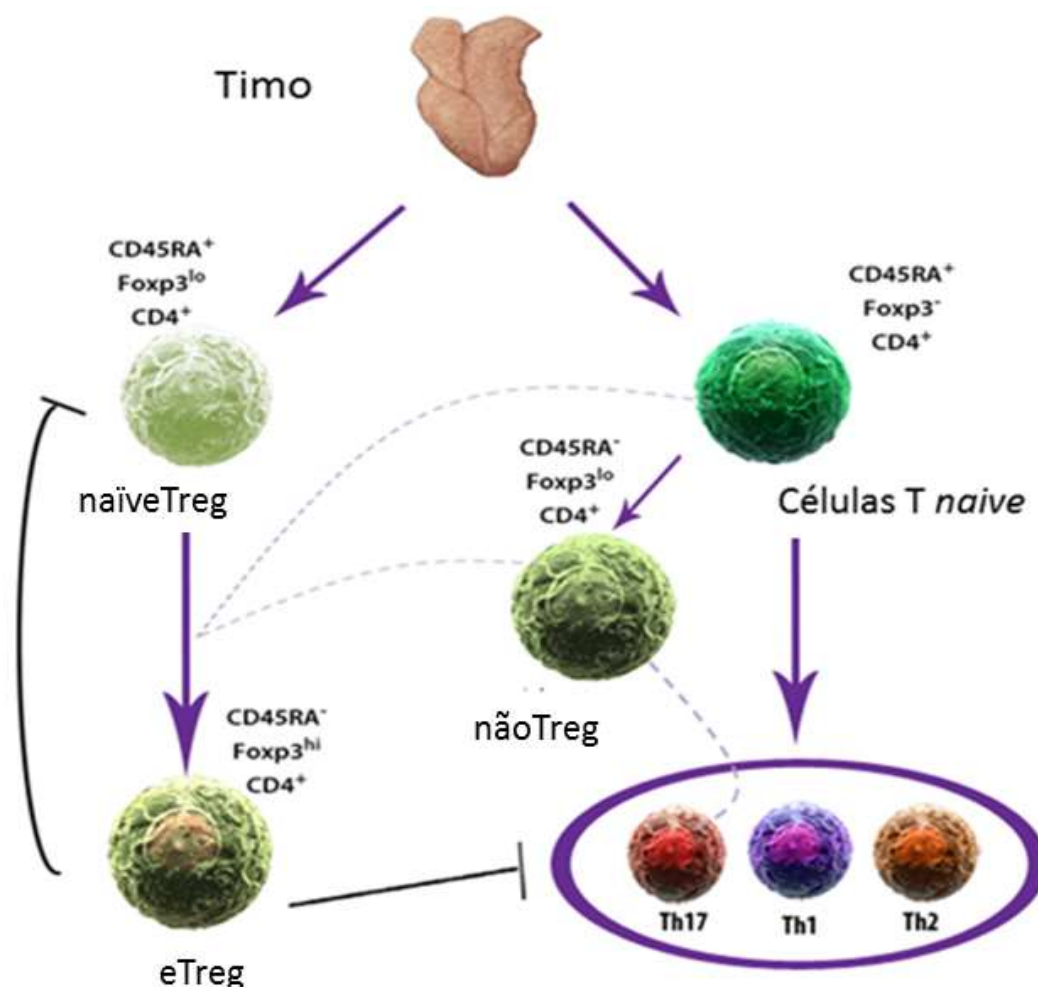
Dentre os subtipos supracitados, os mais bem caracterizados até então, são os das células nTregs, diferenciadas pelo fenótipo CD4⁺FOXP3⁺ CD25^{high}CD127^{low/-} e o das células Tr1 observadas no grupo com fenótipo CD4⁺FOXP3^{+/-} IL-10⁺. As nTregs atuam no controle de células autorreativas promovendo a autotolerância, e, as do perfil Tr1 estão principalmente

relacionadas a redução do dano tecidual em reações imunes (SAKAGUCHI et al., 2010; GREGORI et al., 2012; ANDOLFI et al., 2012; MIYARA; ITO ; SAKAGUCHI, 2014).

De acordo com Miyara et al. (2009), as células Tregs $CD4^+FOXP3^+$ podem ainda ser divididas em três subpopulações caracterizadas pela expressão de CD45RA e FOXP3. Desta forma, células com o fenótipo $CD4^+FOXP3^{low}CD45RA^+$ configuram o grupo de células em repouso (naïveTreg), $CD4^+FOXP3^{high}CD45RA^-$ o de células ativadas ou efetoras (eTreg) e $CD4^+FOXP3^{low}CD45RA^-$ o de células (nãoTreg) que não apresentam atividade supressora, conforme observada nos dois primeiros subtipos citados.

Há evidências de que as células naïveTreg ($CD4^+FOXP3^{low}CD45RA^+$) deixam o timo, e, na periferia, mediante estimulação antigênica, tornam-se ativadas, proliferam e se convertem no subtipo eTreg ($CD4^+FOXP3^{high}CD45RA^-$) (MIYARA et al., 2009). As células eTregs por sua vez, atuam na supressão da resposta Th1, Th2, Th17 e têm um curto período de vida, entrando em apoptose logo após exercer sua atividade supressora. Além disso, a elevada proliferação do subtipo eTreg reduz a proliferação do subtipo naïveTreg, em um *feedback* negativo que culmina com o esgotamento de células Treg. Adicionalmente, uma pequena fração das células eTregs podem ser oriundas do subtipo não-Treg *in vivo*, bem como o subtipo nãoTreg, proveniente da diferenciação de células T *naïve*, pode apresentar forte polarização Th17 (MIYARA et al., 2009; MIYARA et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3: Dinâmica de diferenciação das células T $CD4^+$ que expressam FOXP3. O fenótipo eTreg pode derivar de células naïveTregs provenientes, do timo, de nonTregs, de células T $CD4^+$ FOXP3⁻ naïve ou ativadas. As células eTregs suprimem a proliferação e função das células T efectoras Th1, Th2 e Th17 e a ativação das naïveTregs.



Fonte: Adaptado de Miyara et al., 2011

Para a identificação dos diferentes estados de ativação dos subtipos de células Treg, certos receptores de superfície celular, podem, apesar de não serem específicos para um dado subtipo, corroborar com a compreensão do seu estado de ativação; tais como a expressão dos receptores de quimiocinas CCR4 (migração tecidual) e CCR7 (migração para linfonodo) (FÖRSTER et al., 2008;

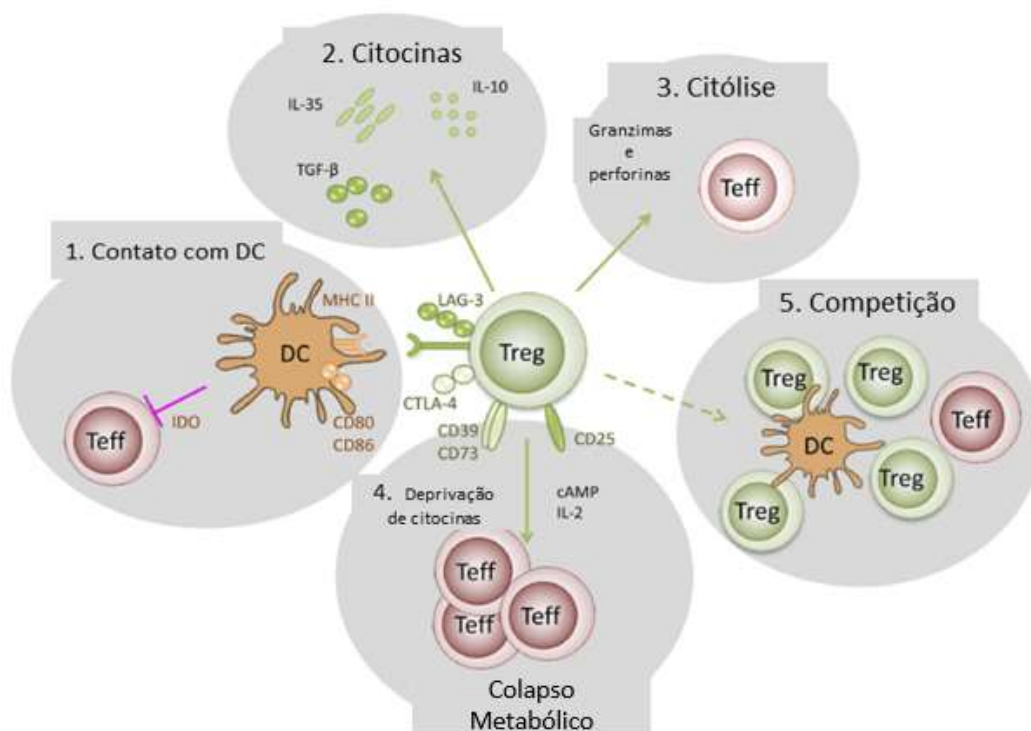
SAKAGUCHI et al., 2010). Enquanto que CCR4 é crucial para a migração tecidual dos linfócitos T sob condições normais e inflamatórias, sendo sua expressão relacionada a células T efetoras e de memória efetoras; a expressão de CCR7 está relacionada à migração de células T virgens para órgãos linfoides secundários (FÖRSTER et al., 2008; MORA; ANDRIAN, 2006).

As células Treg ativadas podem atuar por diferentes mecanismos de supressão. Sugere-se que estas células controlem as respostas imunes através de: contato celular mediado por receptores co-estimulatórios presentes na superfície celular das células apresentadoras de antígeno (APCs), resultando na redução ou extinção da sinalização de APCs para células *naïve* ou efetoras (1); liberação das citocinas IL-10, TGF β e IL-35 (2); citólise das células efetoras com a produção de granzimas e perforinas (3); perturbações metabólicas ao promover a privação de elementos requeridos para a proliferação de células *naïve* ou efetoras, estimulando, por exemplo, APCs a produzir enzimas que possam degradar aminoácidos essenciais à proliferação destas células (4); competição com células efetoras pela ativação via APC ou competição por citocinas como IL-2 (5) (SAKAGUCHI et al., 2010; CARIDADE et al., 2013) (Figura 4).

A interleucina 2 (IL-2), inicialmente identificada como fator de crescimento de células T, estimula a conversão de células T *naïve* em células T efetoras. As células Treg expressam níveis mais elevados de CD25 (receptor de IL-2) do que as células T efetoras; acarretando assim, a privação de IL-2 no microambiente e o consequente comprometimento do desenvolvimento das células T efetoras (LASTOVICKA et al., 2013; KLATZMAN; ABBAS, 2015).

IL-2 é de fundamental relevância para a redução da polarização Th17 de células T CD4⁺ *naïve*. A redução da produção desta citocina observada em pacientes com LES ocasiona a expansão do perfil Th17 com elevada produção de IL-17 e instalação da inflamação local (ALCOCER-VARELA; ALARCON-SEGOVIA, 1982; CRISPÍN et al., 2008).

Figura 4: Mecanismos propostos para a supressão periférica exercida pelas células Tregs. Inibição de APCs (1); liberação de citocinas anti-inflamatórias (2); indução de citólise das células efectoras (3); privação de nutrientes para as células efectoras (4); competição pela ativação mediada por APCs (5).



Fonte: Adaptado de Caridade et al., 2013.

Através dos mecanismos indicados acima, as células Tregs podem inibir a ativação de células B, a ativação e expansão de células T CD4⁺ e

diferenciação das células T CD8⁺ citotóxicas (TAKAHASHI, 2000, THORNTON, SHEVACH, 1998; MCNALLY et al., 2011; LIM et al., 2005).

A maior parte das evidências acerca dos mecanismos de supressão das células Tregs provém de experimentação *in vitro*, no entanto, permanece a questão se estes mecanismos também se aplicam *in vivo*. A compreensão destes mecanismos supressores pode promover importantes *insights* para a sua manipulação positiva ou negativa das células Tregs *in vivo*, o que pode favorecer o desenvolvimento de tratamentos alternativos para o LES (SHEVACH et al., 2009; MIYARA; ITO ; SAKAGUCHI, 2014).

Em resposta aos diferentes estímulos do meio, as células Tregs podem apresentar alterações nos estados de ativação e nos mecanismos de supressão (TODA; PICCIRILLO, 2006). As populações de células T convencionais e nTregs, podem sofrer significativa redução mediada por IFN α . Isto pode estar relacionado a linfopenia observada nos pacientes em atividade e a redução da ativação do fenótipo nTreg (BUANEC et al., 2011). Por outro lado, a expansão de células Tregs, sob fortes condições inflamatórias no LES, parece resultar na incapacidade de controle adequado das células T efetoras para a manutenção da tolerância periférica. O que acarreta um aumento massivo e descontrolado de células efetoras, amplificando ainda mais a progressão da doença (SAKAGUCHI et al., 2010; OHL; TENBROCK1, 2015).

As principais falhas nos mecanismos supressores de células Treg em doenças autoimunes compreendem um número inadequado de células Tregs (devido a defeitos no desenvolvimento, proliferação ou sobrevivência); anomalias funcionais intrínsecas às células Tregs; resistência de células T

efetoras patogênicas a supressão mediada pelas células Tregs devido a fatores inerentes às próprias células, ou ao microambiente inflamatório (com elevadas concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IL-15 e células da via Th17) (BUCKNER, 2010).

De acordo com Miyara e colaboradores (2009), o estudo das subpopulações de células Tregs é fundamental para se avaliar o estado imunológico do paciente, visto que prováveis manipulações de uma subpopulação, em particular, poderiam tanto promover quanto atenuar uma variedade de respostas imunes, de natureza fisiológica ou patológica.

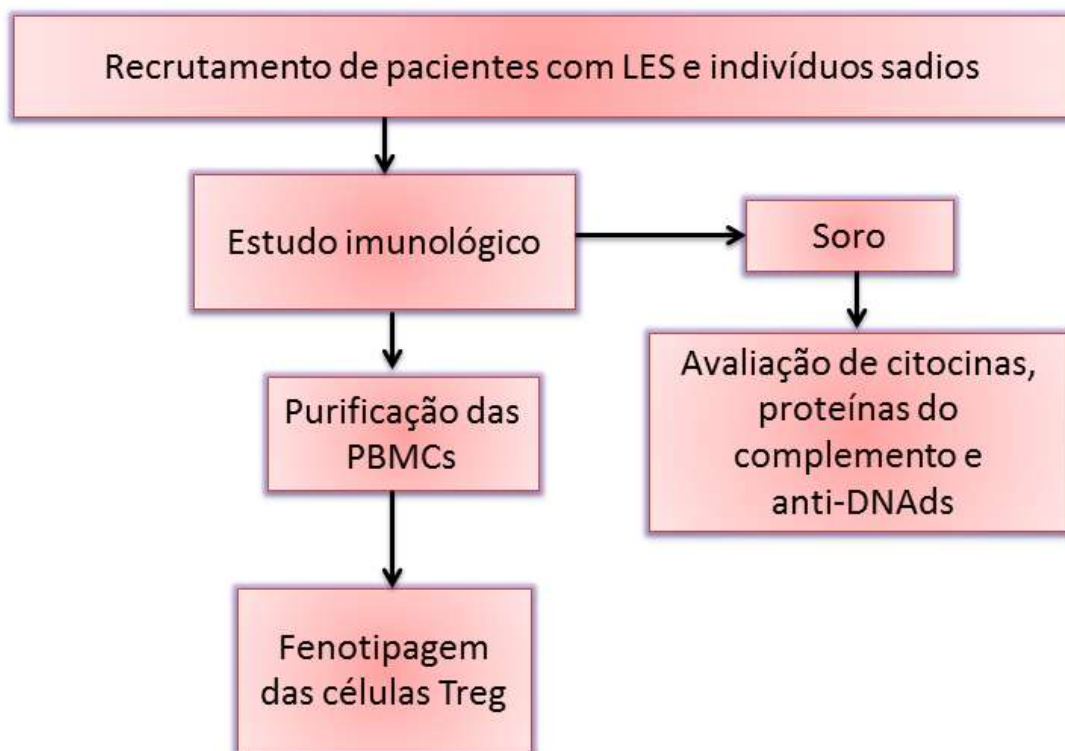
Dada a complexidade do LES, o percentual das subpopulações de células Tregs e suas respectivas funções podem variar não apenas de acordo com o grau de atividade da doença; e, consequentes condições inflamatórias adversas, mas também de acordo com diferentes intervenções terapêuticas adotadas (SAKAGUCHI et al., 2010; TSELIOS et al., 2014; OHL; TENBROCK, 2015).

Análises de características fenotípicas e funcionais de células Tregs provenientes de pacientes com LES acumulam uma série de dados divergentes. Alguns estudos demonstram habilidade supressora deficiente (LEE et al., 2008 ; YAN et al., 2008), outros não confirmam estes dados (ZHANG et al., 2008; BONELLI et al., 2008) ou refletem grandes oscilações das subpopulações estudadas (PAN et al., 2012, MIYARA, et al., 2005; ALVARADO-SANCHEZ et al., 2006). Contudo, as células Treg são indispensáveis para a prevenção de doenças auto-imunes (MIYARA; ITO ; SAKAGUCHI, 2014); o que fomenta novos estudos que visem uma melhor compreensão do envolvimento destas células no LES.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 5: Delineamento experimental do estudo.



4.2 PACIENTES E VOLUNTÁRIOS SADIOS

Foram incluídos neste estudo 115 pacientes (112 mulheres e 3 homens, com idade média de 36 ± 5.65 anos), sendo 86 com a doença em atividade (SLEDAI ≥ 6) e 29 em remissão (SLEDAI < 6). O grupo controle foi constituído por 32 mulheres e 1 homem, saudáveis, com idade média de 44 ± 1.41 anos, sem diagnóstico para doenças reumáticas ou inflamações crônicas e agudas. Todos os pacientes deste estudo foram recrutados do serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE,

Brasil e preencheram os critérios de classificação para o LES do *American College of Rheumatology*. Foram considerados como critérios de exclusão pacientes que se recusaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), gravidez, pacientes que haviam feito pulsoterapia com metilprednisolona (pelo menos no último mês que precedeu a coleta da amostra), ou utilizado altas doses de esteróides (maior ou igual a 1 mg / kg / dia de prednisona). Parâmetros laboratoriais adicionais, clínicos e demográficos foram avaliados através dos registros do hospital e revisados pela equipe médica. O índice de atividade da doença - *SLE disease activity index 2000* (SLEDAI – 2K) foi utilizado para mensurar a atividade do LES. Pacientes com SLEDAI ≥ 6 foram considerados em atividade (n=15), e, com SLEDAI < 6 em remissão (n=15) (Gladman D, 2000). Todos os pacientes e voluntários sadios que participaram deste estudo assinaram o TCLE aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco – Brazil (CAAE–01420172000-09).

4.3 PARÂMETROS LABORATORIAIS

As amostras de soro, provenientes do sangue periférico dos pacientes, foram obtidas e estocadas a -80°C até o uso. As concentrações séricas das citocinas IL-35, TGF- β 1 e IL-10 foram mensuradas através de kits específicos de ELISA, seguindo as recomendações dos fabricantes (IL-35 e TGF- β 1 – eBiosciences / IL-10 - BD Biosciences). A análise de Anti-DNAs foi conduzida pelo método de imunofluorescência indireta com o substrato *Chritidia luciliae* com o kit da Inova Diagnostics (San Diego, EUA). Os fatores do complemento

C3 e C4 foram avaliados pela técnica da imunoturbimetria (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

4.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs)

O sangue periférico coletado em tubos de heparina sódica (16 mL) foi diretamente submetido ao gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) em tubos falcons de 50mL. Após centrifugação a 400 x g por 40 min sob 22°C, foi obtido o anel de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Estas células foram recuperadas e lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2), sob centrifugação de 350 x g por 15 min. As PBMCs, assim lavadas, foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Uma alíquota destas células foi retirada para a contagem em câmara de Neubauer com a utilização do corante azul de Trypan (Sigma, St. Louis, MO) para análise de viabilidade.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS DE CÉLULAS TREGs

PBMCs (obtidas segundo item anterior) foram dispostas na concentração de 10^5 células/tubo de citometria e foram subsequentemente lavadas com PBS (pH 7.2, TA). Em seguida, as PBMCs foram ressuspensas em 100 μ L de PBS para a marcação com os anticorpos de superfície celular (anti-CD4, CD45RA, CCR7, CD25 adquiridos da Ebioscience, e anti-CD127, CCR4 da BD Biosciences), durante 30 min, a 4°C. Para a marcação com os anticorpos intracelulares as células foram permeabilizadas e processadas de acordo com o

protocolo “*Human FOXP3 Buffer Set*” BD Pharmigen (San Diego, CA). Brevemente, após a permeabilização e lavagens das células, foi feita a marcação com o anticorpo intra-celulare anti- FOXP3 (eBiosciences). Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz e com refrigeração. Por fim, as células devidamente marcadas com anticorpos intracelulares e de superfície foram lavadas e ressuspendidas em 500 µL de PBS. O procedimento de marcação celular foi realizado de acordo com os dois painéis indicados no quadro 2. Na sequência as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo (Attune® Cytometric) com a utilização dos softwares *Attune® Cytometric Software version 1.2.5* para aquisição e do software *FlowJo 7.6.5 (Tree Star Inc.®)* para análise dos dados. Foram adquiridos em média 100.000 eventos por amostra e as análises foram feitas a partir da delimitação da região linfocitária conforme gráfico de Dispersão Frontal (FSC) por Dispersão Lateral (SSC). Desta região, a população positiva para CD4 foi avaliada quanto à expressão dos marcadores CD45RA e FOXP3 de acordo com os fenótipos: $CD4^+FOXP3^{LO}CD45RA^+$ (células em repouso – rTreg), $CD4^+FOXP3^{hi}CD45RA^-$ (células ativadas – eTreg), $CD4^+FOXP3^{LO}CD45RA^-$ (células não Treg). Estas subpopulações foram avaliadas ainda quanto a expressão de CCR4 e CCR7. Em paralelo, foram mensurados os fenótipos de células Tregs naturais - nTreg ($CD4^+ FOXP3^+ CD25^+ CD127^-$). A delimitação das regiões positivas foi feita com base na população não marcada para o anticorpo de interesse e na definição da região negativa a partir do controle FMO (*Fluorescence Minus One*).

Quadro 2. Painéis de anticorpos utilizados para imunofenotipagem das células Tregs.

Anticorpo	Fluorocromo	Isotipo	Fornecedor	Clone
PAINEL 1				
Foxp 3	PE	Mouse IgG1, k	Ebioscience	236A/E7
CD197	APC	Rat IgG2a, k	Ebioscience	3D12
CD45RA	PerCP-Cyanine5.5	Mouse IgG2b, k	Ebioscience	HI100
CD194	PECy7	Mouse (C57BL/6) IgG1,k	Biosciences	1G1
CD4	FITC	Mouse IgG1, k	Ebioscience	RPA-T4
PAINEL 2				
Foxp 3	PE	Mouse IgG1, k	Ebioscience	236A/E7
CD127	PerCP-Cyanine5.5	Mouse IgG1, κ	Biosciences	eBioRDR5
CD25 (IL-2R)	PECy7	Mouse IgG1, k	Ebioscience	BC96
CD4	FITC	Mouse IgG1, k	Ebioscience	RPA-T4

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises de dados que não seguiram a distribuição normal foram realizadas através de comparações univariadas por meio de testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis). Para dados que seguiram a normalidade, foram aplicados testes paramétricos (T test or one-way ANOVA). A correlação de dados não paramétricos foi feita através do Spearman Test. Nossos dados foram plotados com o Graph Prism® version 6.0 e os resultados são indicados considerando o valor da mediana, máximo e mínimo. Análises de regressão linear múltipla foram utilizadas para aumentar a acurácia das correlações dependentes de duas ou mais variáveis. O teste F foi devidamente aplicado para validar as correlações com múltiplas variáveis, sendo considerado $P < 0.05$ significativo para todos os testes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO 1 (submetido a *Disease Markers*)

IL-35, IL-10 and TGF- β Serum Levels in Brazilian Patients with Systemic Lupus Erythematosus

Helena Lima da Silva Neta¹; Henrique de Ataíde Mariz^{1,2}; Pablo Ramon Gualberto Cardoso¹; Rodrigo Gomes de Arruda³; Sayonara Maria Calado Gonçalves¹; Michelly Cristiny Pereira¹; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹, Ivan da Rocha Pitta¹; Claudia Diniz Lopes Marques²; Angela Luzia Branco Pinto Duarte²; Maira Galdino da Rocha Pitta^{1*}.

1. Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino - NUPIT SG, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE- Brasil.

2. Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE – Brasil

3. Faculdade Nova Roma, Recife, Brazil

Keywords: Cytokines; serum levels; Autoimmune Disease; Nephritis

Abbreviated Title: Treg-related cytokines in Brazilian SLE patients

Conflict of interest: none.

*Correspondence:

Maira Galdino da Rocha Pitta.

Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (Nupit SG), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil.

E-mail: mgrpitta@gmail.com

E-mail addresses in order: silvanetahlj@gmail.com,
 henriqueamariz@yahoo.com.br, prgc@outlook.com,
 sayonara_123_6@hotmail.com, michelly2305@yahoo.com.br,
 moacyr.rego@gmail.com, irpitta@gmail.com, claudia.reumatologia@gmail.com,
 angelabduarte@hotmail.com, mgrpitta@gmail.com

Abstract

Objective and Design: The present study aims to assess TGF- β , IL-10 and IL-35 serum levels from Systemic Lupus Erythematosus (SLE) patients and its correlation with clinical and laboratory parameters.

Material: Cytokines levels were assessed in 115 patients who fulfilled the American College of Rheumatology classification criteria for SLE. Clinical and laboratory parameters were recorded.

Methods: TGF- β , IL-10 and IL-35 serum concentrations were determined by specific ELISA kits per the manufacturer's recommendation. Statistical analyzes were performed by nonparametric univariate comparisons or multiple linear regression.

Results: TGF- β serum levels were significantly lower in SLE patients (31.25; 31.25 – 1000 pg/mL) than healthy volunteers (60; 31,25 - 966 pg/mL) ($p = 0.001$). On the other hand, IL-35 levels were higher in patients (0.78; 0.78- 185.6 pg/mL) than in healthy volunteers (0.78; 0.78- 27.94 pg/mL) ($p=0.03$) whereas IL-10 showed no significant differences between groups ($p>0.05$). In addition, nephritis was related to decrease TGF- β in patients ($p=0.01$).

Conclusions: Our data demonstrate that SLE patients had increased IL-35, decreased TGF- β and low serum levels of IL-10. This could suggest a defective suppression role of Treg cells in SLE. Further clinical investigations are needed to elucidate potential biomarkers of activity in SLE; to better understand immune

status of patients and promote therapeutic strategies with greater specificity and efficacy.

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by loss of tolerance to nuclear self-antigens, involving T and B lymphocytes hyperactivity, autoantibody production and several abnormalities in function of immune-inflammatory system [1,2]. Nephritis is major SLE complication which can affect about 60% of patients [3]. It is triggered by glomerular deposition of immune complexes that cause inflammation followed by tissue damage [4,5].

Due complexity and severity of the SLE, great are the efforts to identify biomarkers that can quantify the risk of future organ involvement or monitor disease course [6]. Among the multiple immune abnormalities characteristic of this disease, recent studies highlight cytokines involvement in each step of the SLE pathogenesis [7]. Not surprisingly, Interleukin-10 (IL-10) and Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), Treg related cytokines, are found deeply deregulated in SLE. These cytokines suppress the inflammatory response and has been suggested as biomarkers for SLE activity [8–11].

Among the inhibitory actions in proinflammatory pathway, IL-10 promotes positive regulation of growth and differentiation of B cells and auto-antibody production [12]. Classically, elevated IL-10 serum levels in SLE patients have been positively correlated with SLE disease activity [3,13]. Nonetheless, several studies in mice have reported the complexity of IL-10 action in SLE pathogenesis [14,15]. Some studies have shown a promoting and others a protective role,

since IL-10 can not only stimulate B cells and autoantibody production but also downregulate inflammatory T cells response [14].

TGF- β 1 has a large role in the control of autoimmunity. It regulates both proinflammatory and immunosuppressive activities [16,17]. Similarly to IL-10, TGF- β 1 has pleiotropic effects. Its plays a dual role in the development of organ damage in multiorgan autoimmune diseases [15,17]. The reduced TGF- β 1 levels in immune cells predispose an immune dysfunction, while the enhancement of this cytokine can lead to deregulated tissue repair, progressive fibrogenesis and eventual end-organ damage [17].

Besides IL-10 and TGF- β 1, IL-35 is a relative novel immunomodulatory cytokine secreted by Regulatory T cells (Tregs) [18,19]. This cytokine is required for maximal Treg suppressive activity and is considered a potential novel therapeutic target in autoimmune diseases and cancer [18,20].

Despite the consensus that IL-10, IL-35 and TGF- β 1 are involved in SLE pathogenesis [3,8,10,20] little is known about the clinical significance of these cytokines in disease. Therefore, the aim of this study was to evaluating IL-10, IL-35 and TGF- β 1 serum levels in SLE patients and its correlation with clinical and laboratory parameters.

Materials and methods

Patients and control

Patients who fulfilled the American College of Rheumatology classification criteria for SLE [22,23] were recruited from the Rheumatology service of Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco. One hundred and

fifteen SLE patients (112 women / 3 men, mean age 36 ± 5.65 years) participated in this study. We consider as exclusion criteria patients that refused to sign the consent term, pregnancy, comorbidities, who had done pulse therapy with methylprednisolone in the last month or those using high-dose of steroids (greater than or equal to 1 mg / kg / day of prednisone). Thirty-three healthy individuals (32 women and 1 man, 44 ± 1.41 years) negative for SLE and immunodeficiency undiagnosed constituted the control group. IL-10, IL-35 and TGF- β 1 were measured in SLE patients and control group. Demographic, clinical and laboratory parameters were recorded and summarized in Table 1. SLE disease activity index 2000 (SLEDAI – 2K) was used to assess active disease by a score lower than six or higher [21]. All participants of this study signed a consent form approved by Ethical Committee of Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE/Brazil (CAAE–01420172000-09).

Insert Table 1 here.

Laboratory parameters

Serum samples from peripheral blood were obtained from all subjects, aliquoted and stored at -80°C until use. Anti-dsDNA and serum complement factors (C3, C4, CH50) were measured consistent with American College of Rheumatology criteria for the classification of SLE [22,23]. Total serum cytokines concentrations were measured by specific quantitative sandwich ELISA technique according to the manufacturer's recommendation (IL-35 and TGF- β 1 range detection were 0.78-100 pg/mL and 31.25-1000 pg/mL, respectively, eBiosciences and IL-10 range detection was 7.8-1000 pg/mL, BD Biosciences).

Statistical analyzes

Statistical analyzes of IL-10, IL-35 and TGF- β 1 serum levels versus clinical and Laboratory findings of SLE patients were performed by univariate comparisons using nonparametric Mann-Whitney test. For correlation analyses of nonparametric data Spearman test was utilized. Data were plotted with Graph Prism version 6.0 and the results are shown considering the median, minimum and maximum value. In addition to clinical correlation with cytokine serum levels, we applied multiple linear regression analysis. The F test was properly used to validate the correlations with multiple variables, being considered $p < 0.05$ significant for all tests.

Results

IL-10, IL-35 and TGF- β 1 serum levels in SLE patients

TGF- β 1 serum levels were significantly lower in SLE patients (31.25; 31.25 - 1000 pg/mL) compared to healthy volunteers (60; 31.25 - 966 pg/mL) ($p = 0.001$) (Figure 1A). On the other hand, IL-35 serum levels interquartile range was higher in SLE patients (0.78; 0.78- 185.6 pg/mL) than in healthy volunteers (0.78; 0.78- 27.94 pg/mL) ($p=0.03$) (Figure 1B). IL-10 levels in patients (7.81; 7.81 – 535 pg/mL) and control group (7.81; 7.81 – 154.8 pg/mL) had no significant differences ($p= 0.31$) (data not shown).

Insert Figure 1 here.

Nephritis is related to TGF- β decreased

We investigated the individual influence of SLE clinical features on the different expression pattern of TGF- β 1 and IL-35 in patients. Nephritis ($p = 0.01$), alopecia ($p = 0.09$), complement protein reduction ($p = 0.79$) and autoantibody formation ($p = 0.35$) together explain about 1.92% of the variability of TGF- β 1 levels in SLE, with poor significance by the F test ($p = 0.11$). In equivalent analysis, these same clinical parameters together explain only 0.7% ($p=0.95$) of the variability of IL-35 expression; and exert a weak individual influence ($p> 0.05$) on the expression of this cytokine (Table 2). Serum levels of the all cytokines investigated do not vary according to age or SLEDAI score ($p>0.05$) (data not shown).

Insert Table 2 here.

Discussion

TGF- β 1 serum levels reduction has been reported in SLE patients, what is consistent with the immunosuppressive activity of this cytokine [8,10,24]. Evaluation of several cytokines and chemokines related to SLE active demonstrated that TGF- β 1 decreased was the most consistent cytokine abnormality in patients [8].

Although lower TGF- β 1 rates found in SLE patients, similar to Jin et al. [2012], we did not identify a significant correlation between TGF- β 1 levels and SLEDAI score. As discussed by the authors, this could be associated with the huge variability in SLE activity [24]. Other studies indicate that TGF- β plasma levels [11,25] or gene expression [26] do not vary according to disease activity.

We also found elevated serum levels of IL-35 in SLE patients regardless of disease activity. There are few reports of IL-35 serum levels in SLE. Ouyang and coworkers [20] detected a decreased serum levels of IL-35 in patients with active SLE compared with healthy controls and with inactive SLE. This study supported the hypothesis that decreased levels of IL-35 may alter the balance of Th17 and Treg cells in SLE patients, facilitating disease development. Previous reports have also show that IL-35 is critical for Treg activity, suppress effector T cells and Th17 activity profile [18,27]. Moreover, a probable cause of SLE is imbalance between Th17 and Treg cells [28,29].

On the other hand, in accordance with our findings, Cai [28] and coworkers found IL-35 increased plasma levels in active and inactive SLE patients with low level of IL-35 receptor (gp130) on CD4⁺ helper (Th) cells. These data suggests that an elevated level of IL-35 is not sufficient for the production of effector regulatory T cells and inflammation suppression [30].

In turn, numerous reports showed higher IL-10 serum levels correlated with SLE disease active in groups of patients with SLEDAI lower or higher than six [31–33]. In addition, anti-IL-10 therapy promotes SLE remission [10]. Houssiau and colleagues detected IL-10 in the serum of only 37.5% SLE patients studied and reported a positive correlation with disease activity [33]. However, these authors did not explore clinical features of the patients with low IL-10 serum levels. This could agree with our data since the patients in this study also presented low serum levels of IL-10. Furthermore, although 83,47% of the patients use steroids, we did not observe elevation of IL-10 levels, a known effect related to these drugs [34,35].

All SLE patients in this study were in treatment with steroids, antimalarial agents, azathioprine and mycophenolate mofetil as shown in Table 1. This limitation of our study should be considered since such drugs may affect our results. Other studies of this nature also share this difficulty [11,24,30]. In this study, we found that serum levels of TGF- β 1, IL-10 and IL-35 have not changed in relation to the treatment adopted ($p > 0.05$; data not shown). This suggests a homogeneous selected patients group.

Serum levels of the cytokines evaluated did not vary according to SLEDAI score. However, we found TGF- β 1 expression correlated with nephritis involvement ($p = 0.01$, see Table 2), what is in accordance to previous reports [24,36]. Although the remission of histopathology characteristics of lupus flare and nephritis has been observed in the MRL / lpr mice upon IL-35 treatment [37], we did not identify any relationship between nephritis and IL-35 serum levels or any other specific clinic manifestation. Probably because nephritis, alopecia, complement proteins reduction and autoantibody formation together explains only 0.7% (R-squared) of the variability of IL-35 in our sample (see Table 2).

Self-tolerance failure is one of the main characteristics of SLE (38). Therefore, the reestablishment of the balance between regulatory and effector T cells has been discussed in search of new therapeutic strategies for this disease; and cytokines are strongly required for the homeostasis of these cells [19,39–41]. In another approach, promising SLE anticytokine therapies requires more accurate clinical studies [42].

In general, most studies conducted in SLE context group a number of conflicting data. This may be associated with a number of limitations observed in

several studies, such as wide heterogeneity of clinical manifestations, medication used and lack of outcome measures in SLE [42].

Our results demonstrate that SLE patients had increased IL-35, decreased TGF- β 1 and low serum levels of IL-10. This could be related to a Treg profile expansion with defective suppression role in SLE, but more studies are needed to affirm this theory. Since the suppressive activity of these cells involves IL-35, TGF- β 1 and IL-10 secretion [43]. In another approach, these data could suggest a protective role of IL-35 in SLE progress; since the disease activity is related to high levels of IL-10 [34], which was not observed in our patients. However, it was not possible to identify any strong correlations between the expression of these cytokines and the SLEDAI score. This may be related to the small number of patients with SLEDAI > 6 in this study. Therefore, further clinical SLE investigations are needed to elucidate potential biomarkers of disease activity in order to better understand immune status of patients and promote therapeutic strategies with greater specificity and efficacy.

Acknowledgments

This study was supported by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

References

1. Carroll MC. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(10):825–31.
2. Liu Z, Davidson A. Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med [Internet]*. 2012;18(6):871–82.
3. Beebe AM, Cua DJ, De Waal Malefyt R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: Systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(4–5).
4. Tucci M, Quatraro C, Lombardi L, Pellegrino C, Dammacco F, Silvestris F. Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: Role of interleukin-18. *Arthritis Rheum*. 2008;58(1):251–62.
5. Avihingsanon Y, Hirankarn N. Major lupus organ involvement: severe lupus nephritis. *Lupus*. 2010;19:1391–8.
6. Liu C-C, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskelet Dis [Internet]*. 2013;5(4):210–33.
7. Apostolidis SA, Lieberman LA, Kis-Toth K, Crispín JC, Tsokos GC. The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res [Internet]*. 2011;31(10):769–79.
8. Becker-Merok A, Eilertsen GO, Nossent JC. Levels of transforming growth factor-beta are low in systemic lupus erythematosus patients with active disease. *J Rheumatol*. 2010;37(10):2039–45.
9. Dolff S, Bijl M, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CGM, Abdulahad WH. Disturbed Th1, Th2, Th17 and Treg balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2011;141(2):197–204.
10. Manolova I, Gerenova J, Ivanova M. Serum levels of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in patients with systemic lupus erythematosus and Hashimoto's thyroiditis. *Eur Cytokine Netw [Internet]*. 2013;24(1):69–74.

11. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*. 2015;72(2):146–53.
12. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 1992;89(5):1890–3.
13. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Yebra-Bango M, Tutor-Ureta P, Rosado S, et al. Monocytes and T lymphocytes contribute to a predominance of interleukin 6 and interleukin 10 in systemic lupus erythematosus. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2009;76(4):261–70.
14. Peng H, Wang W, Zhou M, Li R, Pan HF, Ye DQ. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. Vol. 32, *Clinical Rheumatology*. 2013. p. 1255–66.
15. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. 2015;74(1):27–34.
16. Wahl SM. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol [Internet]*. 1992;12(2):61–74.
17. Saxena V, Lienesch DW, Zhou M, Bommireddy R, Azhar M, Doetschman T, et al. Dual roles of immunoregulatory cytokine TGF-beta in the pathogenesis of autoimmunity-mediated organ damage. *J Immunol [Internet]*. 2008;180(3):1903–12.
18. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(November 2007):566–9.
19. Okamoto A, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Regulatory t-cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus. Vol. 2011, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011.
20. Ouyang H, Shi Y-B, Liu Z-C, Wang Z, Feng S, Kong S-M, et al. Decreased

interleukin 35 and CD4+EBI3+ T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci* [Internet]. 2014;348(2):156–61.

21. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* [Internet]. 2002;29(2):288–91.
22. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25(11):1271–7.
23. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1997;40(9):1725.
24. Jin T, Almehed K, Carlsten H, Forsblad-d'Elia H. Decreased serum levels of TGF-beta1 are associated with renal damage in female patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2012;21(3):310–8.
25. Shah K, Lee WW, Lee SH, Kim SH, Kang SW, Craft J, et al. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2010;12(2):R53.
26. Rastin M, Soltani S, Nazemian F, Sahebari M, Mirfeizi SZ, Tabasi N, et al. Expression of T helper 17 and regulatory T cell cytokines and molecules in glomerulonephritis class IV systemic lupus erythematosus. *Iran J Kidney Dis*. 2016;10(3):113–8.
27. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(11):3021–9.
28. Yang J, Yang X, Zou H, Chu Y, Li M. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(8):1366–72.
29. Ma J, Yu J, Tao X, Cai L, Wang J, Zheng SG. The imbalance between regulatory and IL-17-secreting CD4+ T cells in lupus patients. *Clin*

Rheumatol. 2010;29(11):1251–8.

30. Cai Z, Wong CK, Kam NW, Dong J, Jiao D, Chu M, et al. Aberrant expression of regulatory cytokine IL-35 in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2015;24(12):1257–66.
31. Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16(3):283–8.
32. Godsell J, Rudloff I, Kandane-Rathnayake R, Hoi A, Nold MF, Morand EF, et al. Clinical associations of IL-10 and IL-37 in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:34604.
33. 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* [Internet]. 1995;4(5):393–5.
34. Mohmad Abozaid H, El-Fetouh S, Mohammed RH. Serum interleukin-18 and interleukin-10 levels in systemic lupus erythematosus: correlation with SLEDAI score and disease activity parameters. *Egypt Rheumatol Rehabil*. 2014;41(4):160.
35. Hodge S, Hodge G, Flower R, Han P. Methyl-prednisolone up-regulates monocyte interleukin-10 production in stimulated whole blood. *Scand J Immunol*. 1999;49(5):548–53.
36. de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen I a, van Zoelen M a D, Pater JM, van den Pangaart PS, et al. Prednisolone dose-dependently influences inflammation and coagulation during human endotoxemia. *J Immunol*. 2007;178(3):1845–51.
37. Edelbauer M, Kshirsagar S, Riedl M, Billing H, Tönshoff B, Haffner D, et al. Activity of childhood lupus nephritis is linked to altered T cell and cytokine homeostasis. *J Clin Immunol*. 2012;32(3):477–87.
38. Cai Z, Wong CK, Dong J, Chu M, Jiao D, Kam NW, et al. Remission of systemic lupus erythematosus disease activity with regulatory cytokine IL-

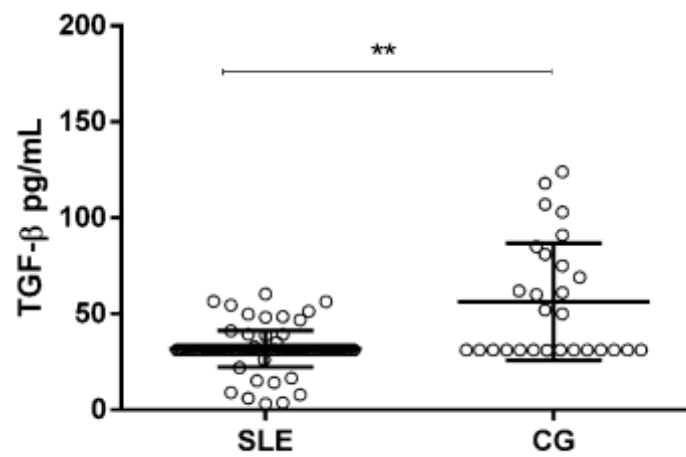
- 35 in MRL/lpr mice. Clin Exp Immunol [Internet]. 2015;(II):253–66.
39. Sthoeger Z, Sharabi A, Mozes E. Novel approaches to the development of targeted therapeutic agents for systemic lupus erythematosus. Vol. 54, Journal of Autoimmunity. 2014. p. 60–71.
40. Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. FEBS Lett [Internet]. 2011;585(23):3603–10.
41. Squatrito D, Emmi G, Silvestri E, Ciucciarelli L, D'Elia MM, Prisco D, et al. Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. Auto- Immun highlights [Internet]. 2014;5(2):33–45.
42. Jordan N, Lutalo P, D'Cruz D. Progress with the use of monoclonal antibodies for the treatment of systemic lupus erythematosus. Immunotherapy [Internet]. 2015;7(3):255–70.
43. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol [Internet]. 2015;15(5):283–94.

Table 1: Patients clinical and demographic data

Patients		N = 115
Age (yrs), Mean (range)		36 $\pm$ 5.65 (19-65)
Sex, N (%)		
Female		112 (97.4)
Male		3 (2.6)
Anti-dsDNA, N (%)		
Positive		27 (23.47)
Complement, N (%)		
Decreased		74 (64.4)
Treatment, N (%)		
Steroids		96 (83.47)
Antimalarial agents		76 (66.08)
Azathioprine		54 (46.95)
Micophenolate mofetil		18 (15.65)
Disease activity (SLEDAI), N (%)		
86 (74.78)		
< 6		29 (25.22)
≥ 6		
Nephritis, N (%)		
Active		20 (17.39)

Figure 1: Cytokines serum levels in SLE patients (SLE) and healthy donors. Serum levels of (A) TGF- β (**p=0.001); (B) IL-35 (*p=0.03).

(A)



(B)

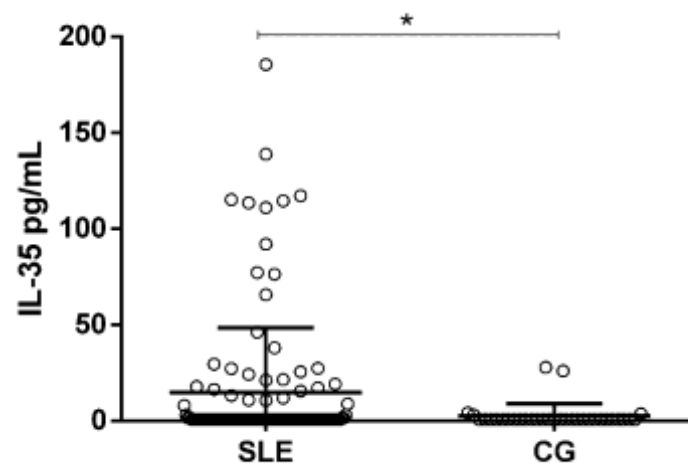


Table 2: Clinical parameters influence on TGF- β and IL-35 serum levels of SLE patients

TGF- β	Coef.	Std. Err.	P> t	R-squared	Prob > F
Nephritis	-36.77	13.95	0.01	0.0192	0.11
Alopecia	2.50	20.38	0.90		
Anti-dsDNA	-15.12	16.15	0.35		
Complement	7.31	28.12	0.79		
IL-35	Coef.	Std. Err.	P> t	R-squared	Prob > F
Nephritis	-1.09	7.60	0.88	0.007	0.95
Alopecia	-2.12	7.16	0.76		
Anti-dsDNA	1.90	6.66	0.77		
Complement	1.29	5.82	0.82		

5.2 ARTIGO 2: (submetido a *The Journal of Rheumatology*)

CD4⁺CD45RA⁻FOXP3^{low} REGULATORY T CELLS ARE POTENTIAL BIOMARKERS OF DISEASE ACTIVITY IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTES

Helena Lima da Silva Neta¹; Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro²;
Mardonny Bruno de Oliveira Chagas¹; Henrique de Ataíde Mariz^{1,3}; Rodrigo
Gomes de Arruda⁴; Michelly Cristiny Pereira¹; Audrey Romano⁵; Ivan da Rocha
Pitta¹; Viviane Ferreira de Vasconcelos²; Claudia Diniz Lopes Marques^{1,3};
Angela Luzia Branco Pinto Duarte³; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹ ;
Maira Galdino da Rocha Pitta^{1*}.

¹ Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

² Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Brazil.

³ Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

⁴ Faculdade Nova Roma, Recife, Brazil

⁵ Centre for Immunology & Infection, Department of Biology and Hull York Medical School, University of York, York, United Kingdom

*Corresponding author:

Email: mgrpitta@gmail.com

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is the prototype of systemic autoimmune disorders. Treg cells imbalance has been reported in SLE. However, studies in this context presented several conflicting data. We hypothesize that these divergences arise from the different clinical parameters that constitute SLEDAI score for each sample of SLE patients investigated. To test our hypothesis, we suggest sample standardization based in SLEDAI score. Therefore, we investigated Treg cells in SLE patients and compared to clinical features. Treg immunophenotyping was performed using CD4, CD25, FOXP3, CD127 markers in 30 SLE patients (15 active/15 SLE remission) and 15 healthy volunteers. CD4⁺FOXP3⁺ Treg activation state was investigated based on CD45RA; FOXP3, CCR7 and CCR4 expression. We showed a significant increase in the frequency of CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells in SLE patients. However, unlike all other Treg cells phenotypes analyzed or chemokine receptor pattern, only eTreg (CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻) (p=0.01) subtype was inversely correlated with disease activity while nonTreg (CD4⁺FOXP3^{low}CD45RA⁻) (p=0.003) exerted a direct influence. Importantly, nonTreg cells were the most consistent SLE active indicator, confirmed by multivariate regression analysis model. In summary, our results suggest the use of sample standardization based in SLEDAI score to increase accuracy in further SLE investigations and highlights nonTreg cells as a new biomarker to promote search for effective therapeutic strategies in SLE.

Keywords: autoimmune disease; SLEDAI; lymphocytes; regulatory T cells; FOXP3, nonTreg cells, biomarker.

INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the presence of antibodies against self-antigens. SLE evolves by unpredictable episodes of intense inflammatory activity and remission, with localized or systemic damage. During this disease, injured tissues can occur in any part of the body, and damage to vital organs and tissues such as the brain, blood, and the kidneys are present in the most severe cases (1) (2) (3).

In clinical practice, treatment depends on the manifestations of the disease; usually corticosteroid and immunosuppressant drugs are used. However, in a long-term treatment, patients become refractory to these conventional drugs. This can reduce chances of controlling the disease activity and increase death risk (4).

Searching for new therapeutic strategies for autoimmune diseases, regulatory T cells (Tregs) have a prominent place (5). Tregs cells play a key role in maintaining self-tolerance and suppression of deleterious immune responses to the patient. Abnormalities in peripheral tolerance mechanisms mediated by these cells are the cause of various autoimmune diseases (6) (7) (8) (5).

SLE pathogenesis is related to defects in Treg cell homeostatic control (11). Therefore, the disease development may be the result of an imbalance in immune system effector and regulatory T cells. This imbalance is associated with an inadequate number, phenotype or defective function of Treg cells observed in SLE (12) (8).

FOXP3 is a key transcription factor for Treg pathway. Cells termed “naturally occurring Treg cells” (nTreg or tTreg) that can be identified by the phenotype $CD4^+FOXP3^+CD25^+CD127^-$ are widely studied in SLE; however, conflicting

results are reported in their definition and function (13) (14). Some studies show poor suppressive ability (15) (16), others do not confirm these data (17) (18) or reflect a wide variability among the subtypes studied (19) (20) (21) (22). In addition, different activation status of CD4⁺FOXP3⁺ Treg cell can be investigated based on the expression of CD45RA and FOXP3. Thus, cells having CD4⁺FOXP3^{low}CD45RA⁺ phenotype set the resting cells group (naïveTreg), CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻ the effector cells (eTreg) and CD4⁺FOXP3^{low}CD45RA⁻ the nonTreg cells (nonTreg) that have showed no suppressive potential, different from the others CD4/FOXP3/CD45RA subtypes (12).

Based on the SLE complexity, all percentage of Treg cell subpopulations and their functions vary according to the severity of the disease and the therapeutic course taken (23) (24). However, the influences of Treg cell subtypes on SLE activity remain poorly understood. Further investigation on Treg cells subsets involved in the different clinical outcomes will contribute to define new therapeutic strategies (5) (23) (24). In this study, we investigated the different Treg cells subsets in SLE patients with variable clinical features.

MATERIALS AND METHODS

Patients and control

Thirty patients (28 women and 2 men) with an age average of 35.33 (± 10.40) years were invited to participate in this study. The control group consisted of 15 healthy women with an age average of 34.19 (± 11.16) without diagnosis for autoimmune disease. All patients were recruited from the Rheumatology Service of Hospital das Clinicas, Federal University of Pernambuco and met the

classification criteria for SLE of the American College of Rheumatology (25). Exclusion criteria were: patients who refused to sign the free and informed consent term, pregnancy, comorbidities, patients who had done pulse therapy with methylprednisolone (in the last month prior to sample collection), or used high dose steroids (greater than or equal to 1 mg / kg / day of prednisone). Clinical, laboratory and demographic parameters were assessed and summarized in Table 1. The activity index of the disease - SLE disease activity index 2000 (SLEDAI - 2K) was used to measure the activity of SLE. Patients with SLEDAI ≥ 6 were considered active ($n = 15$), and with SLEDAI ≤ 6 in remission ($n = 15$) (26). All patients and healthy volunteers who participated in this study signed a consent form approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco - Brazil.

Laboratory parameters

Serum samples, obtained from patients peripheral blood, were processed from separating gel tubes and stored at -80°C until use. Anti-dsDNA analysis was performed by indirect immunofluorescence with *Chritidia luciliae* substrate using Inova Diagnostics kit (San Diego, USA). C3 and C4 complement factors were evaluated by Immunoturbimetry technique (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and CH50 by immunohemolysis technique.

Purification of Mononuclear cells from peripheral blood (PBMC)

The peripheral blood collected in heparin tubes was directly added to Ficoll-Hypaque gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) in 50 mL falcon tube. After centrifugation at $400 \times g$ for 40 min at 22°C , peripheral blood

mononuclear cells (PBMCs) were recovered and washed twice with PBS (Phosphate-buffered saline) (pH 7.2) at 350 x g for 15 min. The PBMCs were then resuspended in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco) supplemented with L-Glutamine, 10% Fetal Bovine Serum (Lonza), 10 mM HEPES (4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) and 200 U / ml Penicillin / Streptomycin (Gibco). An aliquot of these cells was removed for counting on a Neubauer chamber using Trypan blue (Sigma, St. Louis, MO) as a viability dye.

Determination of cell phenotypes of Treg cells

10^5 PBMCs were resuspended in 100 μ L of PBS for labeling with human cell-surface antibodies in two different conditions: 1) -PECy7-conjugated anti-CD25 (BC96; eBioscience), PerCP-Cyanine5.5-conjugated anti-CD127 (eBioRDR5; eBioscience) and FITC-conjugated anti-CD4 (RPA-T4; eBioscience) together, or 2) -FITC-conjugated anti-CD4 (RPA-T4; eBioscience), PerCP-Cyanine5.5-conjugated anti-CD45RA (HI100; eBioscience), APC-conjugated anti-CCR7 (3D12; eBioscience), PECy7-conjugated anti-CCR4 (1G1; BD BIOSCIENCES). For intracellular labeling, cells were permeabilized with the "Human FoxP3 Buffer Set" BD Pharmingen (San Diego, CA) according to the manufacturer recommendation. Briefly, after washing and permeabilization of the cells, labeling was performed with the intra-cellular PE-conjugated anti-FOXP3 antibody (236A/E7; eBiosciences). The cell labeling procedure was performed in the dark at 4°C. Finally, the appropriately labeled cells were washed and resuspended in 500 μ L of PBS. A hundred thousand events per sample were acquired by Attune® flow cytometer (software version 1.2.5). Analysis was done with FlowJo 7.6.5 (Tree Star® Inc.), by the delimitation of the lymphocyte region

as the Frontal Scatter (FSC) by Side Scatter chart (SSC). In this region, the CD4 and FOXP3 positive population was measured for the expression of CD25 and CD127. For Treg subsets analysis, CD4 positive cells were evaluated according to the phenotypes: CD4⁺FOXP3^{low}CD45RA⁻ (resting cells - rTreg), CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻ (activated or effector cells - eTreg), CD4⁺FOXP3^{low}CD45RA⁻ (nonTreg cells). These subpopulations were also evaluated for CCR7 and CCR4 expression (Figure S2). The delimitation of the positive regions was based on the non-labeled population for the interest. In order, to increase the analysis accuracy were performed a previous antibody titrations and FMO (Fluorescence Minus One) control (Figure S1).

Statistical analysis

Data analysis that did not follow the normal distribution was performed using univariate comparisons through nonparametric tests (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Kolmogorov-Smirnov). For data that followed the normality, we apply parametric tests (t test or one-way ANOVA). Our data were plotted with the Prism Graph version 6.0 and the results are set considering the median value, maximum and minimum. Multiple linear regression analyzes were used to increase the accuracy of dependent correlations of two or more variables. The F test was properly applied to validate the correlations with multiple variables, being considered $p < 0.05$ significant for all tests.

SSBSS Model

To facilitate the research conducted with different samples of SLE patients, we launched the Sample Standardization Based in SLEDAI Score (SSBSS). In this sample standardization model, we apply multiple linear regression analysis to

verify influence of the sample clinical parameter in SLEDAI score. The same test is applied to the other study variables to check the impact of each on the SLEDAI score. With this model, we aim to understand the wide variations in the immune response observed in SLE patients based on the clinical relevance of the parameters of the SLEDAI for each sample. Thus, immune responses that are well correlated with clinical SLEDAI parameters may be explained in our model.

RESULTS

Naturally occurring Treg cells in SLE patients and healthy donors

We investigated naturally occurring Treg cells in SLE patients and healthy donors according to Figure 1A. Patients with active disease (SLEDAI ≥ 6) or remission (SLEDAI ≤ 6) had the lower proportions of CD4⁺ T lymphocytes (21.10%, 3.76 - 49.20% and 33.9%, 5.12 - 45%, respectively) compared to the healthy individuals (37.6%; 31.5 to 46.7%). A significant reduction was recorded in patients in the active disease group ($p < 0.001$) compared to controls. There was a significant increase in CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells of the patients with active disease (3.73%, 1.31 to 7.01%) and remission (3.54%, 1.39 - 6.97%) in contrast to the healthy individuals (1.63%, 1.05 - 2.79%) ($p = 0.003$). However, this phenotype did not vary according to the disease activity ($p > 0.05$) (Figure 1B). For a more specific T regulatory cell profile analysis, CD25 and CD127 expression were also evaluated in the CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells. For the CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cell profile, there was no significant variations among groups of patients with active SLE (36.38%, 4.70 - 61.80%), remission (28.12%, 3.12 - 63.83%) or healthy subjects (38.80%, from 19.72 to 68.07%) ($p >$

0.05). Likewise, there was no significant difference between all SLE patients (32%; 3123 - 63.83%) and healthy subjects group ($p > 0.05$) (Figure 1C).

CD4⁺CD45RA⁻FOXP3^{low} (nonTreg) and CD4⁺CD45RA⁺FOXP3^{low} (naïve Treg) T cells increased in SLE patients

Since SLE patients showed an increase in CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells, we decided to investigate its subtypes. Based on the differential expression of the CD45RA marker and FOXP3 by CD4⁺ T lymphocytes, naïve Treg (Figure 2A, gate 3), eTreg (Figure 2A, gate 4) and nonTreg (Figure 2A, gate 5) cells were evaluated. When analyzing all SLE patients, 3.6% (0.07 -10.70%) of CD4⁺ T cells were naïve Treg and 1.14% (0.0 to 9.91%) eTreg. These values were higher than those found in healthy volunteers for the same subtypes (naïve Treg: 2.3%; 1.35-4.17% and eTreg: 0.64%; 0.25 - 1.8%), but only naïve Treg increase in SLE patients was significant ($p = 0.034$). The most significant divergence was SLE nonTreg cells rates (9.18%, 1.19 to 34.10%) in contrast to that observed in healthy volunteers for this subtype (4.04%; 2.02 - 11.90%) ($p < 0.0001$). In relation to SLE disease activity, naïve Treg or eTreg pattern did not vary between active and remission patients groups. However, patients with active disease showed the highest levels of nonTreg cells (9.7%, 1.19- 34.10%) compared to the group of patients in remission (9.19%, 1.32 - 15.50%) ($p = 0.002$) (Figure 2B).

CCR7 and CCR4 expression in Treg cells of SLE Patients

To investigate possible differences between the Treg cell subtypes that could be related to SLE disease activity, we evaluated expression of CCR4

(associated with Tregs migration to tissue) and CCR7 (associated with Tregs migration to lymphoid organs) among patients with active disease and in remission. In general, all patients had a significantly lower CCR7 expression in the subtypes eTreg (22%; 0-100%) and nonTreg (16,25%, 0-100%) when compared to naïve Tregs (22,25%; 0-100 %) ($p < 0.0001$). Similar results were found for patients with SLEDAI < 6 ($p = 0.001$) and SLEDAI > 6 ($p = 0.001$). Only for the subtype eTreg the decrease of CCR7 is related to disease activity ($p = 0.030$) (Figure 3A). Additionally, CCR4 expression did not significantly vary according to the disease activity or subtype analyzed ($p > 0.05$) (Figure 3B).

eTreg and nonTreg subsets indicate SLE activity

To deepen the analysis, the influence of Treg cell subtypes on SLE activity, measured by SLEDAI through multiple linear regression analysis, was also evaluated. First, the model significance by F test was evaluated. With this we aimed to investigate the influence of individual clinical parameters already described on the SLEDAI such as hematuria, proteinuria, and alopecia. Supporting the effectiveness of this test, as expected, we found that proteinuria, hematuria, pyuria, alopecia, anti-dsDNA, complement and malar rash explain on average 95.63% (R-squared) of the SLEDAI score in our sample with high significance by F test ($p < 0.0001$). Other SLEDAI clinical parameters were ignored in this analysis because of low frequency and / or variability in our dataset. Proteinuria, hematuria and alopecia represented the largest direct influence on the activity of the disease ($p < 0.001$), followed by complement ($p = 0.001$), rash ($p = 0.035$) and pyuria ($p = 0.043$). Anti-dsDNA antibodies was the parameter that exerted less influence ($p = 0.55$) in our sample. Given the

robustness of this model, we then evaluated the influence of Treg cell subtypes on the SLEDAI score in our sample. The eTreg, nonTreg and naïveTreg together exerted an influence of 28.90% in SLEDAI score variability, with a high significance recorded by F-test ($p = 0.006$). In this more specific type of analysis, it was possible to detect that the eTreg subtype exerts an inverse influence on the severity of the disease ($p = 0.010$), whereas nonTreg subtypes ($p=0.003$) is associated with an increased SLEDAI score. However, the correlation with naïve Treg and the disease activity was not significant ($p = 0.352$). Also, the FOXP3⁺CD4⁺ phenotype ($p = 0.56$) and FOXP3⁺CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ ($p = 0.52$) had low influence on disease activity (1.47%), confirming our previous remarks. Additionally, this poor correlation was indicated by F test ($P = 0.771$), that showed no significant correlation between these phenotypes and the disease activity evaluated by SLEDAI score (Table 2).

Proteinuria, anti-dsDNA and rash are related to eTreg reduction

Since the eTreg and nonTreg subtypes had the greatest influence on the SLE activity, we investigated specific SLEDAI clinical parameters correlated to these Treg subtypes. Thus, these subtypes were evaluated in relation to the clinical SLEDAI that exerted influence on our sample (Table 3). We observed that an increase of proteinuria ($p = 0.006$), anti-dsDNA (0.045), and rash ($p = 0.011$) correlated inversely to the eTreg subtype frequency. Moreover, together, proteinuria, hematuria, pyuria, anti-dsDNA, complement and rash may explain 32.55% (R squared) of population variability of the eTreg subtype on SLE patients ($p = 0.01$) (Table 3). However, a similar analysis for the nonTreg subtype showed that the same set of clinical parameters did not significantly

explain the variability of this subtype in our SLE sample ($p = 0.114$) (data not shown). Therefore, nonTreg cells are the most significant SLE activity indicator identified, but only eTreg phenotype correlates with specific disease clinical manifestations.

DISCUSSION

In this study, we investigated Treg cells in SLE patients with respect to clinical features, and then proposed investigations considering the influence of the most relevant clinical parameters of the sample obtained on the data. This will facilitate more comprehensive analysis from published studies and minimizes divergence of data between different patient samples.

SLE often evolves with hematological disorders including anemia, leukopenia, lymphopenia and thrombocytopenia (27) (28) (29). In our study, this could be confirmed by the reduced proportion of $CD4^+$ T cells in SLE patients, even greater in the group with active disease ($SLEDAI > 6$). On the other hand, the percentage of $FOXP3^+CD4^+$ Treg cells was higher in patients, regardless of disease activity. Pan et al (2012) (21) showed $CD4^+FOXP3^+$ Treg cells higher in patients with $SLEDAI > 5$. While others studies did not show quantitative differences for the same phenotype (20) (30) (13).

Aiming to understand the role of Treg cells in SLE activity, other phenotypes of these cells have been explored in the disease. However, emerging analysis of $CD4^+CD25^+CD127^-$ and $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ cells suggest that this latter is a promising SLE activity indicator, especially in renal involvement and may facilitate the detection of Treg subsets with clinical relevance (22). Therefore, we also investigated $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ phenotype, but we did not observe any variation according to disease activity (data not shown). For more precise

analysis of this phenotype, we also assessed CD127 expression, since according to previous reports the high CD25 expression and low CD127 expression analysis is equivalent to FOXP3 expression (31) (32). However, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ phenotype remained in constant proportions among patients in our sample, regardless of disease activity.

Although higher in SLE patients, CD4⁺ FOXP3⁺ cells were not a good indicator of SLE disease activity. Therefore, we investigated the activation state of CD4⁺ FOXP3⁺ Treg according to differential expression of CD45RA and FOXP3, featuring the subtypes CD4⁺FOXP3^{low}CD45RA⁺ (naïveTreg), CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻ (eTreg) e CD4⁺FOXP3^{low}CD45RA⁻ (nonTreg). Likewise Miyara (2009) (12) and Pan (2012) (21) groups, we also identified larger proportions of naïveTreg and nonTreg subtypes in SLE patients. In accordance with the above studies we detected high percentage of nonTreg cells as hallmark of SLE patients in activity. Since this increase was significantly high, it is possible that the activation of this phenotype is a universal marker of the disease activity. The Miyara group (2009) (12) was also able to observe a significant reduction in eTreg subtype among patients with active disease. Regardless of the convergence of data in different studies, it must be considered that they were conducted with patients in different degrees of disease activity. Also, while our group considered SLEDAI > 6 for patients in activity, other cited studies considered SLEDAI > 3 (12) or SLEDAI > 5 (21). The non-uniformity in patient activity groups is a general limitation of studies with this disease.

In SLE development evaluation of Treg cell subtypes and chemokine receptor expression can indicate the activation state of Treg cells and provide data on

their suppressive capacity (33) (34) (35). Chemokine receptor 4 (CCR4) acts in lymphocytes migration to sites of inflammation, and its expression is associated with effector and effector memory T cells; while chemokine receptor 7 (CCR7) is related to the migration of naive T cells to secondary lymphoid organs (36) (37) (38) (39) (40).

We detected a higher CCR7 expression in naïveTreg on all investigated groups, which is consistent with the resting state of this subtype. Similarly, we found a significant reduction in expression of CCR7 in eTreg and nonTreg in relation to the naïve Treg phenotype, which is also consistent with the activated state of these cells (12). On the other hand, there was a large variability in CCR4 expression from SLE patients. This impaired observation of significant variations of this phenotype related to disease activity or cell activation state. Beyond the expression under physiological conditions, it is known that CCR4⁺ phenotypes may be induced along the immune response mediated by dendritic cells, depending on the cytokines signal and other mediators of inflammation (41) which are deeply deregulated in SLE (42). This may explain the wide variability in CCR4 expression detected and reflects the possibility of impaired Treg suppressive capacity in disease progression.

All these data emphasizes Treg cells subtypes analysis based on CD4, FOXP3 and CD45RA differential expression pattern on SLE clinical features. However, most studies investigate natural Treg phenotype based on CD4 co-receptor, CD25 cytokine receptor and FOXP3 transcription factor expression (14) with the majority of them showings divergent results in SLE (15) (16) (17) (18) (20) (22). We suspect that these differences depend not only from unclear definition on Treg phenotype, as previously reported (22), since assessments of the same

phenotypes provided contradictory results (43) (44). We hypothesized that these divergences arise from the different clinical parameters that constitute SLEDAI score for each sample of SLE patients investigated.

To test our hypothesis, we suggested a new model for investigating clinical correlations of SLE patients based on SLEDAI score. To facilitate, we called this new model SSBSS (Sample Standardization Based on SLEDAI score). Through SSBSS, we showed that proteinuria, haematuria, pyuria, alopecia, anti-DNA, complement and malar rash explain on average 95.63% of SLEDAI score found in our SLE patients group. However, anti-DNA was the clinical parameter that exerted less influence on the increase of the SLEDAI score ($P > 0.05$, Table 2). This can justify, for example, why Pan and coworkers (2012) (21) were able to observe an increase in the frequency of naïve Treg cells related to the development of anti-dsDNA antibody in active SLE and we did not. Therefore, it becomes easy to conclude that in fact this type of correlation can be valid only for groups of patients whose anti-dsDNA is a relevant factor for determining SLEDAI score in sample.

Due to the high robustness of the SSBSS analysis model, we evaluated Treg subsets influence on the SLEDAI score variability in our sample. We found that the analysis of naïve Treg, eTreg and nonTreg together explains 28% of SLEDAI score in our sample. Evaluating the correlation coefficients for each subtype and their respective significance, we concluded that the eTreg subtype is inversely correlated with disease activity ($p = 0.010$) while nonTreg ($p = 0.003$) exerted a direct influence. Although naïveTreg frequencies exerts a direct influence, it was without significance for our sample ($p = 0.352$), as

confirmed by our previous observations. These results confirm that this analysis model is statistically more robust than Individual parameter analysis.

Additionally, this model confirms the low influence exerted by $CD4^+FOXP3^+$ and $CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^-$ cells frequencies on the SLEDAI score, both related only to 1,47% of disease activity. It was also found that proteinuria ($p = 0.006$), anti-dsDNA antibody (0.045) and rash ($p = 0.011$) are associated with eTreg cell reduction. Importantly, despite the fact that formation of anti-dsDNA antibodies was not relevant to the total increase of the SLEDAI score of our sample, we found out that it influences eTreg frequency. Furthermore, analysis of proteinuria, hematuria, pyuria, anti-DNA, complement and rash may explain 32.55% eTreg frequency variations. Equivalent analysis for nonTreg did not identify specific clinical parameters related to frequency of this subtype. Probably because the Treg phenotype can be correlated to multiple variables that go beyond those described in SLEDAI score.

All SLE patients in this study were in treatment with Steroids, Antimalarial agents, Azathioprine, Micophenolate Mofetil and Thalidomide, as shown in Table 1. This limitation of our study should be considered since such drugs may affect our results. Other studies in SLE context also shared this difficulty (10) (45). However, we found that Treg subsets did not change in relation to the treatment adopted ($p > 0.05$; data not shown). This suggests a homogeneous selection of patients.

Our data demonstrate that eTreg and nonTreg frequencies correlates significantly with SLE disease activity. In addition, the use of CD45RA as activation marker in $CD4^+FOXP3^+$ Treg cells, allowed a more accurate analysis of a potential biomarker for active SLE, unlike conventional analysis based on

CD25 and CD127 expression and in FOXP3⁺ CD4⁺ Treg cells. Importantly, we demonstrated that nonTreg subset is a more consistent indicator of SLE activity, which was be confirmed by SSBSS analyzes. We also suggest SSBSS use to increase accuracy in further SLE investigations and we highlight nonTreg cells as an important tool for assessing disease activity in the search for new therapeutic strategies to reduce this phenotype and promoter SLE remission.

ACKNOWLEDGMENTS

This is study was supported by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

REFERENCES

1. Carroll MC. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(10):825-31.
2. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2110-21.
3. Mohan C, Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(6):329-41.
4. Picchianti-Diamanti A, Rosado MM, Scarsella M, Laganà B, D'Amelio R. P-glycoprotein and drug resistance in systemic autoimmune diseases. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):4965-76.
5. Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(9):543-51.

6. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
7. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
8. Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3603-10.
9. Apostolidis SA, Lieberman LA, Kis-Toth K, Crispín JC, Tsokos GC. The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interf Cytok Res*. 2011;31(10):769-79.
10. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*. 2015;72(2):146-53.
11. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(5):283-94.
12. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899-911.
13. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2011;10(12):744-55.
14. Newton R, Priyadharshini B, Turka LA. Immunometabolism of regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2016;17(6):618-25.

15. Lee HY, Hong YK, Yun HJ, Kim YM, Kim JR, Yoo WH. Altered frequency and migration capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(6):789-94.
16. Yan B, Ye S, Chen G, Kuang M, Shen N, Chen S. Dysfunctional CD4+,CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum*. 2008;58(3):801-12.
17. Zhang B, Zhang X, Tang FL, Zhu LP, Liu Y, Lipsky PE. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(7):1037-40.
18. Bonelli M, Savitskaya A, von Dalwigk K, Steiner CW, Aletaha D, Smolen JS, et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int Immunol*. 2008;20(7):861-8.
19. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2005;175(12):8392-400.
20. Alvarado-Sánchez B, Hernández-Castro B, Portales-Pérez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2006;27(2):110-8.
21. Pan X, Yuan X, Zheng Y, Wang W, Shan J, Lin F, et al. Increased CD45RA+ FoxP3(low) regulatory T cells with impaired suppressive function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2012;7(4):e34662.
22. Żabińska M, Krajewska M, Kościelska-Kasprzak K, Jakuszko K, Bartoszek D, Myszka M, et al. CD4(+)CD25(+)CD127(-) and

CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Regulatory T Cell Subsets in Mediating Autoimmune Reactivity in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016.

23. Tselios K, Sarantopoulos A, Gkougkourelas I, Papagianni A, Boura P. Increase of peripheral T regulatory cells during remission induction with cyclophosphamide in active systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis*. 2014;17(7):790-5.

24. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*. 2015;45(2):344-55.

25. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1725.

26. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002;29(2):288-91.

27. Berbert ALCV, Mantese SAO. Cutaneous lupus erythematosus – Clinical and laboratory aspects. *An Bras Dermatol*. 2005;80(2):119-31.

28. Le Buanec H, Gougeon ML, Mathian A, Lebon P, Dupont JM, Peltre G, et al. IFN- α and CD46 stimulation are associated with active lupus and skew natural T regulatory cell differentiation to type 1 regulatory T (Tr1) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(47):18995-9000.

29. Turchetti G, Yazdany J, Palla I, Yelin E, Mosca M. Systemic lupus erythematosus and the economic perspective: a systematic literature review. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(4073):S116–22.

30. Vargas-Rojas MI, Crispín JC, Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of

inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus*. 2008;17(4):289-94.

31. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701-11.

32. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1693-700.

33. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):227-35; quiz 36-7.

34. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):119-30.

35. Alexander T, Sattler A, Templin L, Kohler S, Groß C, Meisel A, Sawitzki B, Burmester G-R, Arnold R, Radbruch A, Thiel A, Hiepe F. Foxp3⁺ Helios⁺ regulatory T cells are expanded in active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(9):1549-58.

36. Förster R, Davalos-Missslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):362-71.

37. Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW. Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med*. 2005;201(7):1037-44.

38. Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S, et al. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* 2006;66(11):5716-22.
39. Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol.* 2006;27(5):235-43.
40. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.
41. Sigmundsdottir H, Butcher EC. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol.* 2008;9(9):981-7.
42. Fransen JH, van der Vlag J, Ruben J, Adema GJ, Berden JH, Hilbrands LB. The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):207.
43. Lyssuk EY, Torgashina AV, Soloviev SK, Nasonov EL, Bykovskaia SN. Reduced number and function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:113-9.
44. Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, Max R, Eckstein V, Blank N, et al. Reduced CD4⁺,CD25⁻ T cell sensitivity to the suppressive function of CD4⁺,CD25^{high},CD127⁻/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008;58(7):2120-30.
45. Cai Z, Wong CK, Kam WK, Dong J, Jiao D, Chu M, Lam CWK, Tam LS. Aberrant expression of regulatory cytokine IL-35 in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2015;24(12):1257-66.

SUPPORTING INFORMATION

Figure S1: Representative plots for CD45RA and FOXP3 FMO controls. No labeled control (A); FMO control for CD45RA positive delimitation (all fluorochromes minus CD45RA marker) (B); FMO control for FOXP3 positive delimitation (all fluorochromes minus FOXP3 marker) (C); All fluorochromes for specific labeling of CD4⁺FOXP3^{Low}CD45RA⁺ (naïveTreg), CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻ (eTreg) and CD4⁺FOXP3^{Low}CD45RA⁻ (nonTreg) cells (D).

Figure 2S: Representative plots of CCR4 and CCR7 expression in CD4⁺FOXP3^{Low}CD45RA⁺ cells (naïveTreg) (A), CD4⁺FOXP3^{high}CD45RA⁻ cells (eTreg) (B) and CD4⁺FOXP3^{Low}CD45RA⁻ cells (nonTreg) (C).

TABLES

Table 1: Clinical and Demographic parameters of SLE Patients

Number of patients	N = 30
Age (yrs), Mean (range)	38.17 ± 10.43 (19-61)
Sex, N (%)	
Female	28 (93.33)
Male	2 (6.66)
Disease duration (Months)	
Mean (range)	96 ± 72.94 (2 - 300)
Anti-dsDNA, N (%)	
Positive	11 (36.66)
Negative	19 (63.66)
Complement, N (%)	
Decreased	19 (63.66)
Normal	11 (36.66)
Treatment, N (%)	
Steroids	26 (86.66)
Antimalarial agents	26 (86.66)
Azathioprine	21 (70)

Micophenolate mofetil	10 (33.33)
Disease activity (SLEDAI), N (%)	
Range	0-20
< 6	15 (50)
≥ 6	15 (50)
Nephritis, N (%)	
Active	10(33.33)
Inactive	20(66.66)

Table 2: Influence of the clinical parameters in SLEDAI score for sample.

SLEDAI	Coef.	Std. Err.	P> t	R-squared	Prob > F
Proteinuria	3.852013	.5833249	0.0001	0.9563	0.00001
Hematuria	6.163777	1.025428	0.0001		
Pyuria	2.298524	1.069623	0.043		
Alopecia	4.367206	.9463755	0.0001		
Anti-dsDNA	.6305338	1.048974	0.554		
Complement	2.060738	.5317556	0.001		
Malar Rash	1.726985	.7675707	0.035		
ETreg	-1.206469	.435602	0.010	0.2890	0.0065
NonTreg	.3915982	.1208674	0.003		
NaïveTreg	.3039881	.3204841	0.352		
*Treg	-.3861103	.6703293	0.569	0.0147	0.7717
**CD25	.998021	1.5654	0.529		

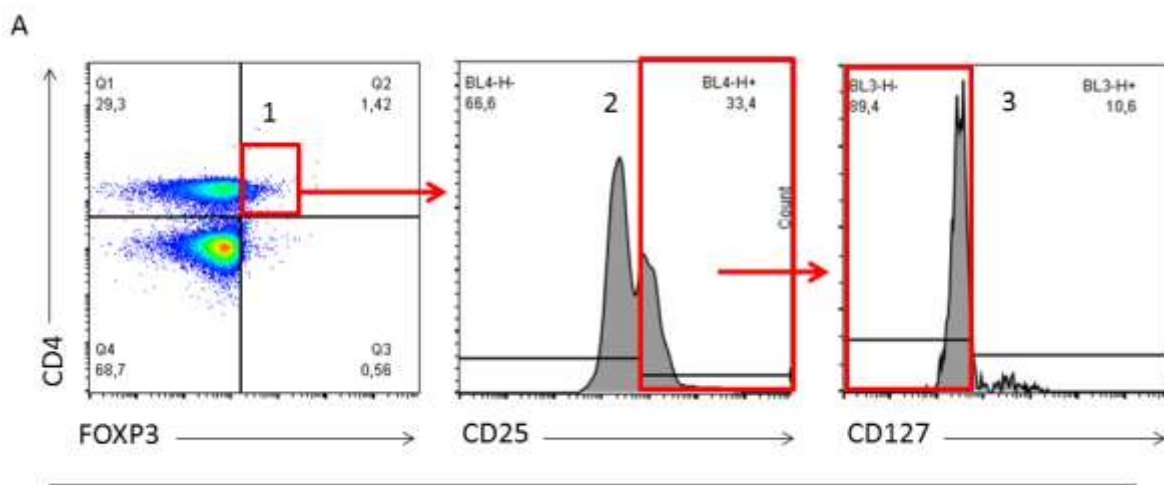
*Treg: CD4⁺FOXP3⁺ cells /** CD25: CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺CD127⁻ cells.

Table 3: Clinical parameters influence in eTreg cells frequencies of SLE patients.

ETreg	Coef.	Std. Err.	P> t	R-squared	Prob > F
Proteinuria	-1.271477	.4145096	0.006	0.3255	0.0163
Hematuria	.3083865	.7977254	0.703		
Pyuria	-.5732928	1.006636	0.575		
Anti-dsDNA	-2.084068	.9786697	0.045		
serum	1.581082	1.260822	0.223		
complement					
Rash	-1.476643	.5323137	0.011		

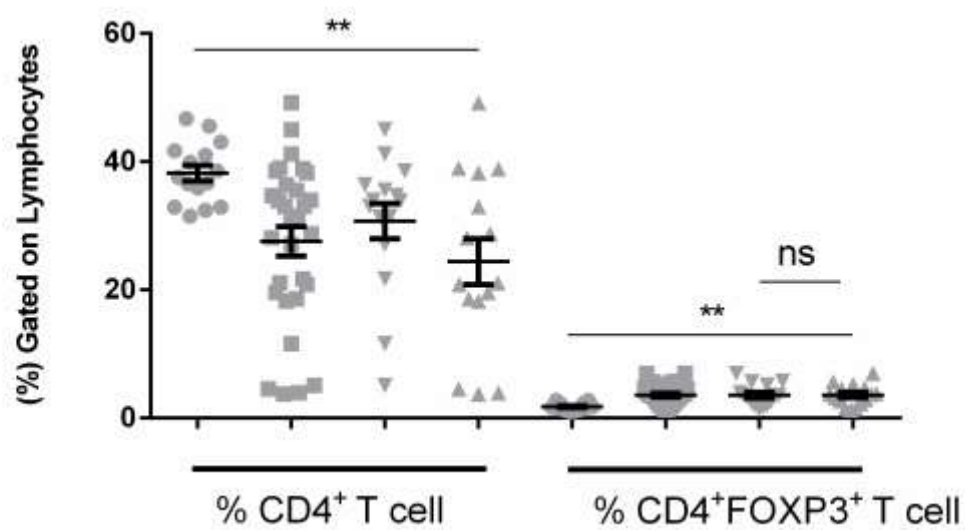
FIGURES

Figure 1: Naturally occurring Treg lymphocytes of SLE patients and healthy individuals. (A) CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺CD127⁻ Phenotyping: CD4⁺FOXP3⁺ cells (1), CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ cells (2), CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺CD127⁻ in CD4⁺FOXP3⁺ cells (3); (B) CD4⁺ T Lymphocytes and CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells; (C) CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺CD127⁻ cells in CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells. **p≤0.002.



- Healthy Individuals
- All SLE patients
- ▼ SLE remission
- ▲ SLE active

B



C

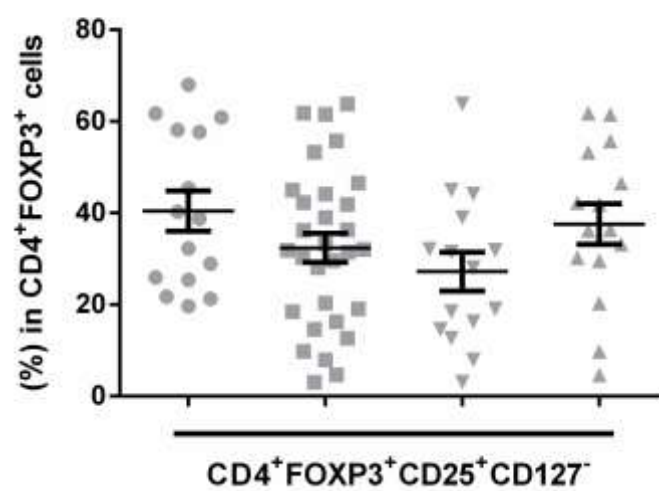
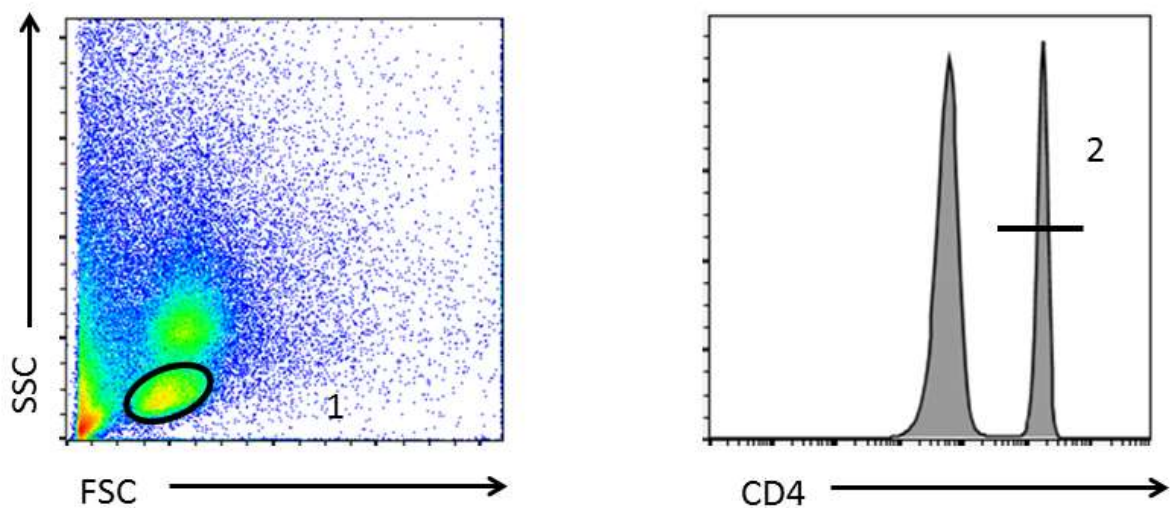
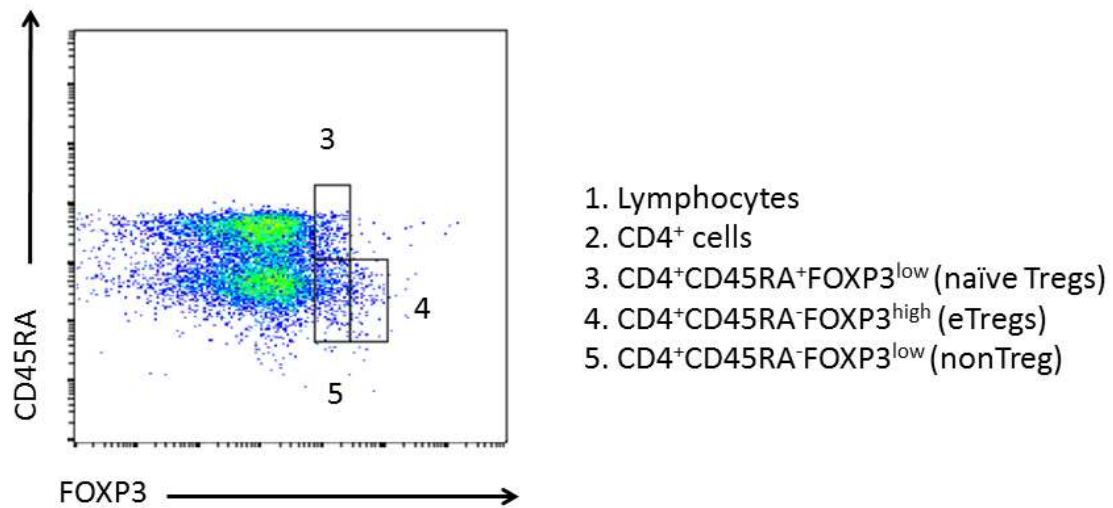


Figure 2: FOXP3⁺ Tregs subset phenotyping in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy donors. (A) Gating strategy for Treg cells characterization in PBMCs: Lymphocytes gate (1); TCD4⁺ Lymphocytes (2); CD4⁺CD45RA⁺FOXP3^{low} (naïve Tregs) (3); CD4⁺CD45RA⁻FOXP3^{high} (eTregs) (4); CD4⁺CD45RA⁻FOXP3^{low} (nonTreg) (5). (B) naïveTreg, eTreg and nonTreg in TCD4⁺ cells. *p < 0.05; **p≤0.002; ***p<0.0001.

A





- Healthy Individuals
- All SLE patients
- ▼ SLE remission
- ▲ SLE active

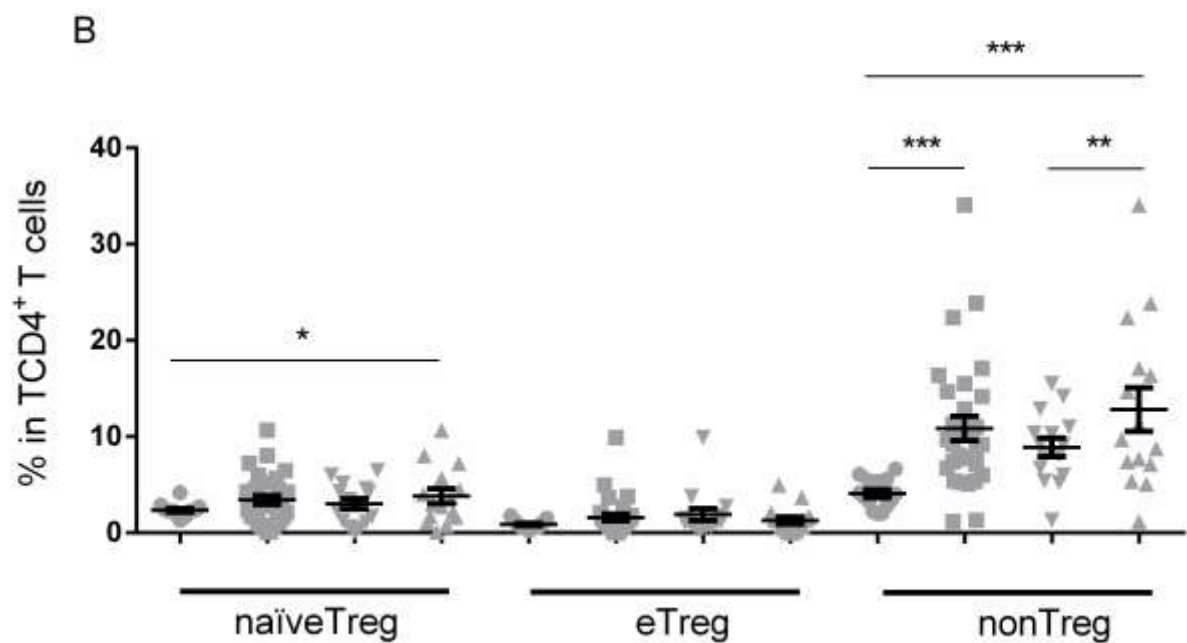


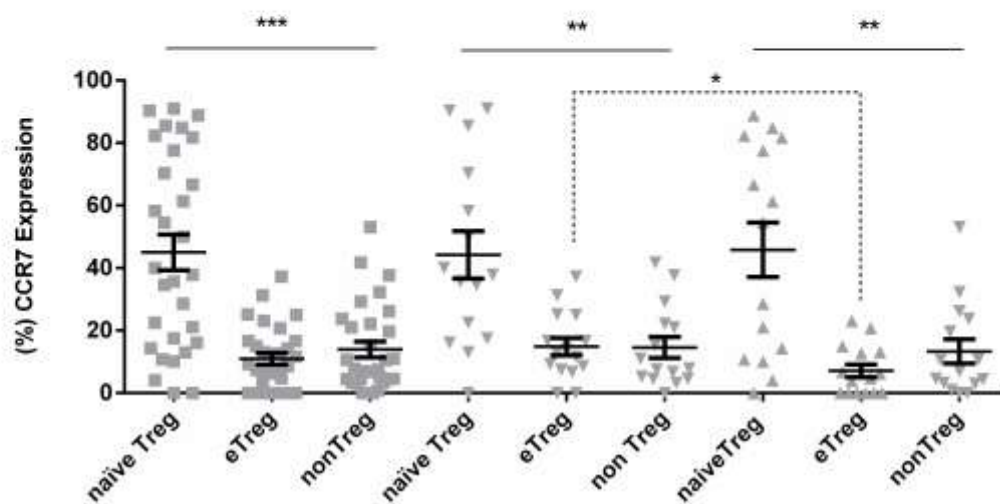
Figure 3: CCR7 (A) and CCR4 (B) expression in naïveTreg, eTreg and nonTreg of SLE patients. * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.002$; *** $p < 0.0001$.

■ All SLE patients

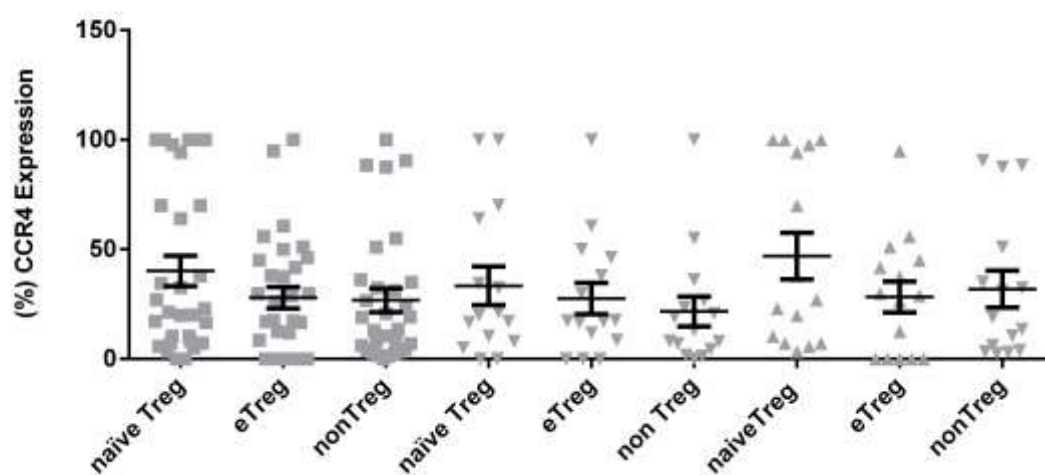
▼ SLE remission

▲ SLE active

A



B



6 CONCLUSÃO

- A elevação dos níveis séricos de IL-35 sugere uma expansão do perfil Treg nos pacientes. Contudo como ela foi acompanhada de uma baixa expressão de TGF β e IL-10, pode-se sugerir atividade supressora deficiente destas células na doença.
- Foi confirmada a expansão do perfil Treg nos pacientes através da análise do fenótipo TCD4⁺FOXP3⁺. No entanto, a imunofenotipagem das células Treg baseada na expressão de CD4, FOXP3, CD25 e CD127 não revelou o perfil celular correlacionado à atividade da doença.
- A análise dos subtipos de células Treg baseada na expressão de CD4, FOXP3 e CD45RA foi eficaz na diferenciação dos fenótipos relacionados à atividade da doença.
- Diferente do subtipo naïveTreg, eTreg e nonTreg apresentaram uma baixa tendência de migração para os linfonodos. Não foi possível avaliar o perfil de migração tecidual destes subtipos devido à grande variabilidade na expressão de CCR4.
- O fenótipo nonTreg é um forte indicador do aumento da atividade da doença avaliada pelo SLEDAI; podendo ser útil no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem a redução deste fenótipo e a remissão da doença.
- Sugerimos a utilização do SSBSS para futuras investigações envolvendo pacientes com LES, a fim de promover uma melhor compreensão dos resultados experimentais em relação a clínica dos pacientes selecionados para o estudo.

7. PERSPECTIVAS

- Analisar o fenótipo $CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^{low/-}$ em relação a expressão sérica de citocinas das vias Th1/Th2/Th17/Th9 e Treg
- Analisar os fenótipos naïveTreg, eTreg e nonTreg em relação a expressão de citocinas das vias Th1/Th2/Th17/Th9 e Treg
- Investigar a elevação do fenótipo $CD4^+FOXP3^+CD25^-$ nos pacientes com LES
- Analisar a expressão gênica de FOXP3, IL-10, TGF- β , IL-17, IL-22, IL-2 em relação a expressão sérica de citocinas das vias Th1/Th2/Th17/Th9 e Treg

REFERÊNCIAS

ALCOCER-VARELA, J; ALARCON-SEGOVIA, D. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 69, n. 6, p. 1388–1392, 1982.

ALVARADO-SANCHEZ, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Autoimmunity**, 27 ,110-118. 2006.

ANDOLFI, G. et al. Enforced IL-10 Expression Confers Type 1 Regulatory T Cell (Tr1) Phenotype and Function to Human CD4+ T Cells. **Molecular Therapy**, 2012.

ANDRADE, L.E.C. O Santo Graal e o lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, n. 49. p. 1-7, 2009.

ANVISA. Agencia nacional de vigilancia sanitária. Produtos Biológicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 Dez 2015.

BAECHLER, E. C. et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n.5, p :2610-2615, 2003.

BAZSÒ, A. et al. The importance of glucocorticoid receptors in systemic lupus erythaematosus. A systematic review. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 4, p. 349-351, 2015.

BECKER-MEROK, A. et al. Circulating interferon-alpha2 levels are increased in the majority of patients with systemic lupus erythematosus and are associated with disease activity and multiple cytokine activation. **Lupus**, v. 22, n.2, p. 155-163, 2013.

BENNETT, L. et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. **J Exp Med**, v. 197, n.6, p. 711-723, 2003.

BERBERT, A. L. C. V.; MANTESE, S. A. O. Cutaneous lupus erythematosus - Clinical and laboratory aspects. **An Bras Dermatol.** n. 80, v. 2, p. 119-31, 2005.

BERTSIAS, et al. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. **EULAR Textbook on Rheumatic Diseases.** p. 476-505, 2012.

BLOCK S. R. et al. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature. **Am J Med.** v. 59, n. 4, 533-52, 1975.

BONELLI, M. et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Int. Immunol.**, p. 861–868, 2008.

BORBA, E. F. et al. Clinical and immunological features of 888 Brazilian systemic lupus patients from a monocentric cohort: comparison with other populations. **Lupus**, v. 22, n. 7, p. 744-9, 2013.

BORCHERS et al. The geoeidemiology of systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews.** v.9, p. A277–A287, 2010.

BUANEC, H. L. et al. IFN- α and CD46 stimulation are associated with active lupus and skew natural T regulatory cell differentiation to type 1 regulatory T (Tr1) cells. **PNAS.** p. 18995–19000, 2011.

BUCKNER, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. **Nature Reviews | Immunology**, p. 849-859, 2010.

CARIDADE, M. et al. Mechanisms underlying CD4CTreg immune regulation in the adult: from experiments to models. **Frontiers in Immunology | TCell Biology**, 2013.

CARROLL, M. C. A protective role for innate immunity. in systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews. IMMUNOLOGY.** v. 4, p. 825-831, 2004.

CARVALHO, M. A. P. et al. Reumatologia - Diagnóstico e Tratamento, 4^a ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2014.

CERVERA, R. et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. **Medicine**, p. 299-308, 2003.

CHAN, O. T.; LOMCHIK, M. J. Cutting edge: B cells promote CD8+ T cell activation in MRL-Fas(lpr) mice independently of MHC class I antigen presentation. **J Immunol**, p. 1658-1662, 2000.

CHAVELE, K. M.; EHRENSTEIN, M. R. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **FEBS Letters**, n. 585, p. 3603–3610, 2011.

CRAMPTON SP , et. al. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. **Dis Model Mech**, v.7, n.9, p. 1033-46,2014.

CRISPÍN, J. C. et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. **Journal of Immunology**, p. 8761–8766, 2008.

DANCHENKO, N. et al. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. **Lupus**, v. 15, n. 5, p. 308-18, 2006.

DAVID KLATZMANN; ABUL K. ABBAS. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. **NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY**, 2015.

DEAPEN D, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** v. 35: 311-8, 1992.

DEVIN M., et al. Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Systemic Lupus Erythematosus Reveals Persistent Hypomethylation of Interferon Genes and Compositional Changes to CD4+ T-cell Populations. **PLOS Genetics**, v. 9. 2013.

Esmaeili SA., et al. Tolerogenic Probiotics: Potential Immunoregulators in Systemic Lupus Erythematosus. **J Cell Physiol**, doi: 10.1002/jcp.25748, 2016.

FÖRSTER, R. et al. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. **Nature Reviews Immunology**, p. 362-371, 2008.

GLADMAN D. D. et al. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J Rheumatol**, v. 29, n. 288, 2002.

GREGORI, S. et al. The cellular and molecular mechanisms of immunosuppression by human type 1 regulatory T cells. **Frontiers in Immunology | TCellBiology**, p. 1-12, 2012.

GUPTA S, KAPLAN MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. **Nat Rev Nephrol**, v.12, p.402-13, 2016.

HADASCHIK et al. Regulatory T cell-deficient scurfy mice develop systemic autoimmune features resembling lupus-like disease. **Arthritis Research & Therapy**, 2015.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the Classification of systemic lupus erythematosus. **Letter. Arthritis Rheum**, 1997.

JARUKITSOPA, S. Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus and Cutaneous Lupus Erythematosus in a Predominantly White Population in the United States. **Arthritis Care & Research**, v. 67, n. 6, p. 817–828, 2015.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E. The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. **J Immunol**, 2003.

KIM, J. M. et al. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. **Nature Immunol.**, 2007.

KLATZMANN, D; ABBAS, A K. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. **Nature reviews | immunology**, p. 283-294, 2015.

KOENIG, K. F. et al. Serum cytokine profile in patients with active lupus nephritis. **Cytokine**. v. 60, n. 2, p. 410–416, 2012.

LASTOVICKA, J. The Phenotypic Markers of CD4+CD25+ T Regulatory Lymphocytes. **Research in Immunology: An International Journal**, 2013.

LEE, H.Y. et al. Altered frequency and migration capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford)** 47 (6), 789–794. 2008

LIM, H. W. et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. **J. Immunol**, p. 4180–4183, 2005.

LIN J., et al., Decreased plasma IL-22 levels and correlations with IL-22-producing T helper cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. **Scand J Immunol**. v. 79, n. 2, p.131-136, 2014.

LISNEVSKAIA, L. et al. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v. 384, p.1878-1888, 2014.

MAK, A.; KOW, N. Y. The Pathology of T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Immunology Research**. p. 1-8, 2015.

MCNALLY, A. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, p. 7529–7534, 2011.

MEROLA, J. F. et al. Clinical manifestations and survival among adults with (SLE) according to age at diagnosis. **Lupus**, p. 1–7, 2014.

MIYARA, M. et al. Human FOXP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, p. 744–755, 2011.

MIYARA, M. et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FOXP3 Transcription Factor. **Immunity**, 30: 899–911, 2009.

MIYARA, M. et. al. T_{REG}-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. **Nat. Rev. Rheumatol.**, 10: 543–551, 2014.

MIYARA, M. Global Natural Regulatory T Cell Depletion in Active Systemic Lupus Erythematosus. **J Immunol**, p. 8392-8400, 2005.

MOHAN, C.; PUTTERMAN, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Nature Reviews | Nephrology**, v. 11, p. 329–341, 2015.

MORA, J. R.; ANDRIAN, U. H. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. **Trends in immunology, Oxford**, p. 235-243, 2006.

NALBANDIAN A., et al. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. **Clin Exp Immunol**, v.157, n. 2, p. 209–215, 2009.

NIE, J. et al. FOXP3+ Treg cells and gender bias in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, 2015.

OHL, K; TENBROCK, K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. **Eur. J. Immunol.**, 45: 344–355, 2015.

OUYANG H., et al. Increased interleukin 9 and CD4+IL-9+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Mol Med Rep**, v.7, n. 3, p. 1031-1037, 2013.

PAN, X. et al. Increased CD45RA+FOXP3low Regulatory T Cells with Impaired Suppressive Function in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **PLoS ONE**, p. 1-11, 2012.

PATHAK, S.; MOHAN, C. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 241, 2011.

PICCHIANTI-DIAMANTI, A. et al. P-Glycoprotein and Drug Resistance in Systemic Autoimmune Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, 2014.

RAHMAN, A.; ISENBERG, D. A. Systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, 2008.

RONNBLOM L;ELKON KB. Cytokines as therapeutic targets in SLE. **Nat Rev Rheumatol.**, 2010

SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. **Nature Reviews | Immunology**. p. 490-500, 2010.

SAKAGUCHI, S. 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.** p. 1151–1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4 regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol.** p. 531-562, 2004.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, 2008.

SATO, E. I. et al. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Rev Bras Reumatol**, v. 42, n.6, p. 362-370, 2002.

SHEVACH, E. M. The Resurrection of T Cell-Mediated Suppression. **J Immunol**, p. 3805-3807, 2011.

SHLOMCHIK, M. J. et al. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 2, p. 147–153, 2001.

SOKRATIS A. et al. The Dysregulation of Cytokine Networks in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of interferon & cytokine research*, v. 31, n. 10, 2011.

SPEE-MAYER, C. et al. Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus Erythematosus. **Ann Rheum Dis**, 2016.

SQUATRITO D, et al. Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. *Auto Immun Highlights*, v. 5, n. 2, p. 33-45, 2014.

STHOEGER, Z. Novel approaches to the development of targeted therapeutic agents for systemic lupus erythematosus. **Journal of Autoimmunity**, 2014.

STYPIŃSKA, B; PARADOWSKA-GORYCKA, A. Cytokines and MicroRNAs as Candidate Biomarkers for Systemic Lupus Erythematosus. **Int. J. Mol. Sci.** 2015

TAKAHASHI, T. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen. **J. Exp. Med.** p. 303–310, 2000.

TALAAT, R. M. et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. **Cytokine**, p. 146–153, 2015.

TAN E. M. et al. Special article: The 1982 revised criteria for the classification of sytemic lupus erythematosus. **Arhritis. Rheum.** p. 1271-1277, 1982.

THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **J. Exp. Med.** p. 287–296, 1998.

TODA A; PICCIRILLO C. A. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory Tcells. **J LeukocBiol**, p. 458–70, 2006.

TRAN, D. Q. et al. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. **Blood**, p. 2983–2990, 2007.

TSELIOS, K. et al. Increase of peripheral T regulatory cells during remission induction with cyclophosphamide in active systemic lupus erythematosus. **International Journal of Rheumatic Diseases**, p. 790–795, 2014.

TSOKOS, G. C. M. D. Systemic Lupus Erythematosus. **N Engl J Med**, n. 365, p. 2110-21, 2011.

TSOKOS, GC, et. al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 12, p. 716-730, 2016.

TSUJIMURA, S.; TANAKA, Y. Treatment strategy based on targeting P-glycoprotein on peripheral lymphocytes in patients with systemic autoimmune disease. **Clin Exp Nephrol.**, v. 6, n. 1, p. 102-8, 2012.

TUCCI, M. et al. Glomerular Accumulation of Plasmacytoid Dendritic Cells in Active Lupus Nephritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 1, p. 251–262, 2008.

TURCHETTI, G. et al. Systemic lupus erythematosus and the economic perspective: a systematic literature review and points to consider. **Clin Exp Rheumatol.**, 2012.

VLIET, H.J.J.; NIEUWENHUIS, E. E. IPEX as a Result of Mutations in FOXP3. **Clinical and Developmental Immunology**, 2007.

WALKER, M. R. et al. Induction of FOXP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25– T cells. **J. Clin. Invest**, p. 1437–1443, 2003.

WANG, J. et al. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. **Eur J Immunol.** p. 129–138, 2007.

WEN ZK, et al. DNA hypomethylation is crucial for apoptotic DNA to induce systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in SLE-non-susceptible mice. **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, p.1796–1803, 2007

WILDIN, R. S. et al. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. **J Med Gene**, p. 537–545, 2002.

WU X. et al. Defective PTEN regulation contributes to B cell hyperresponsiveness in systemic lupus erythematosus. **Science Translational Medicine**. v. 6, p. 246-299, 2014.

XIONG W; LAHITA RG. Pragmatic approaches to therapy for systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol**, v.10, n. 2, p. 97-107, 2014.

XIUJUN PAN et al. Increased CD45RA+FOXP3low regulatory T Cells with Impaired Suppressive Function in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **PLoS ONE**. Volume 7 | Issue 4 | 2012.

YAN, B. et al. Dysfunctional CD4+, CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferonalpha-producing antigen-presenting cells. **Arthritis Rheum**. 58 (3), 801–812. 2008

YEE, C. S. et al. The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology (Oxford)**, v. 178, n. 5, p. 982-988, 2011.

ZHAO S, et. al. Epigenetic perspectives in systemic lupus erythematosus: pathogenesis, biomarkers and therapeutic potentials. **Clin Rev Allergy Immunol** , v.39, p.3–9, 2010.

ZHANG, B. et al. Clinical significance of increased CD4+CD25-FOXP3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. **Ann. Rheum. Dis.** 67 (7), 1037–1040. 2008.

APÊNDICE A - SUPPLEMENTAL MATERIAL (ARTIGO 2)

SILVA-NETA, *et al.*

1.S.

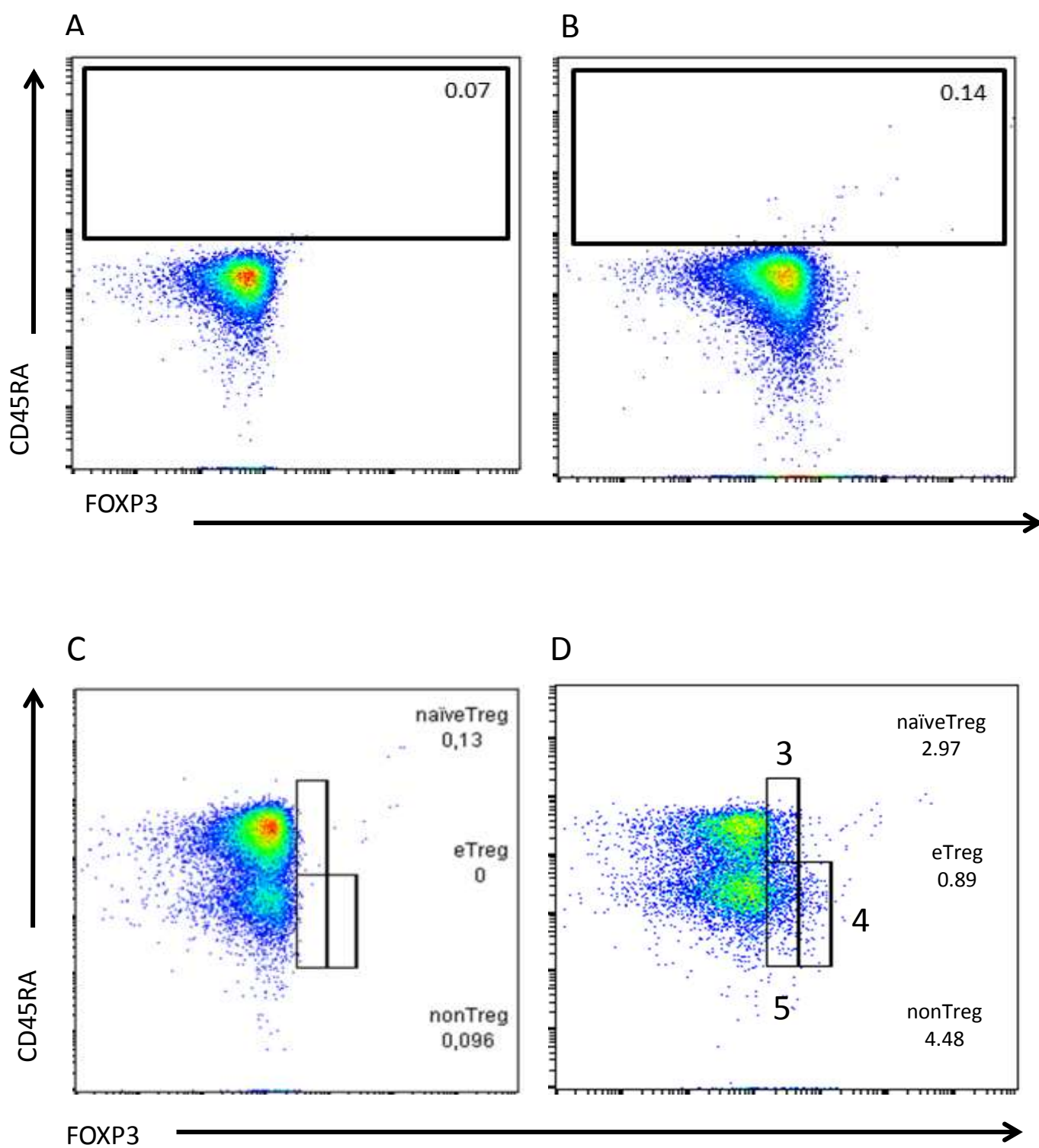
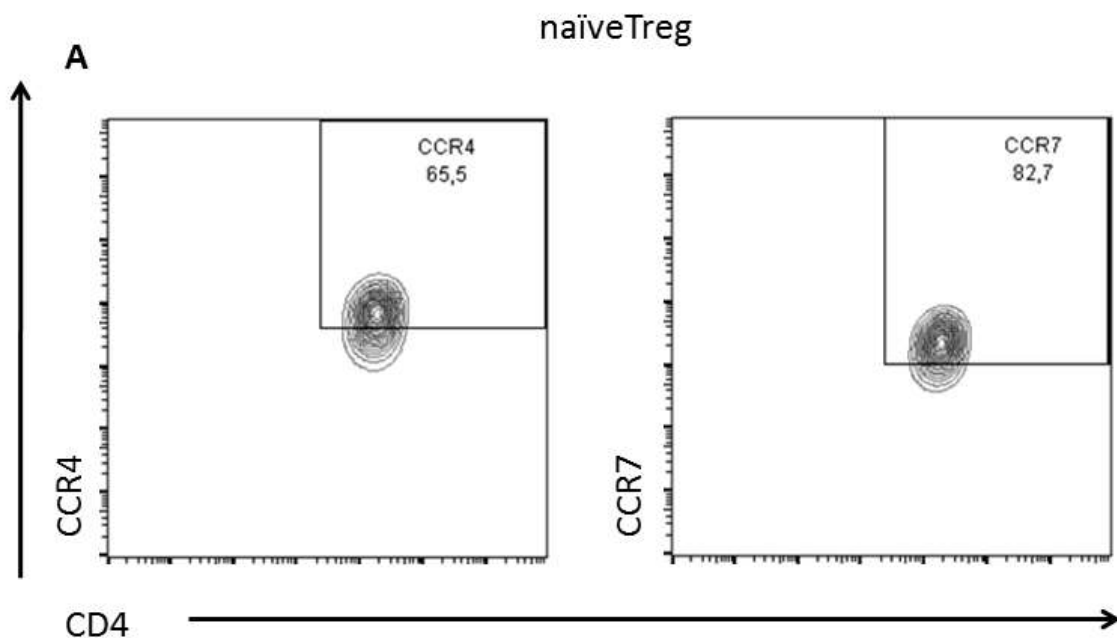


Figure 1S: Representative plots for C45RA and FOXP3 FMO controls. No labeled control (A); FMO control for CD45RA positive delimitation (all fluorochromes minus CD45RA marker) (B); FMO control for FOXP3 positive delimitation (all fluorochromes minus FOXP3 marker) (C); All fluorochromes for specific labeling of $CD4^+FOXP3^{Low}CD45RA^+$ (naïveTreg), $CD4^+FOXP3^{high}CD45RA^-$ (eTreg) and $CD4^+FOXP3^{Low}CD45RA^-$ (nonTreg) cells (D).

2.S.



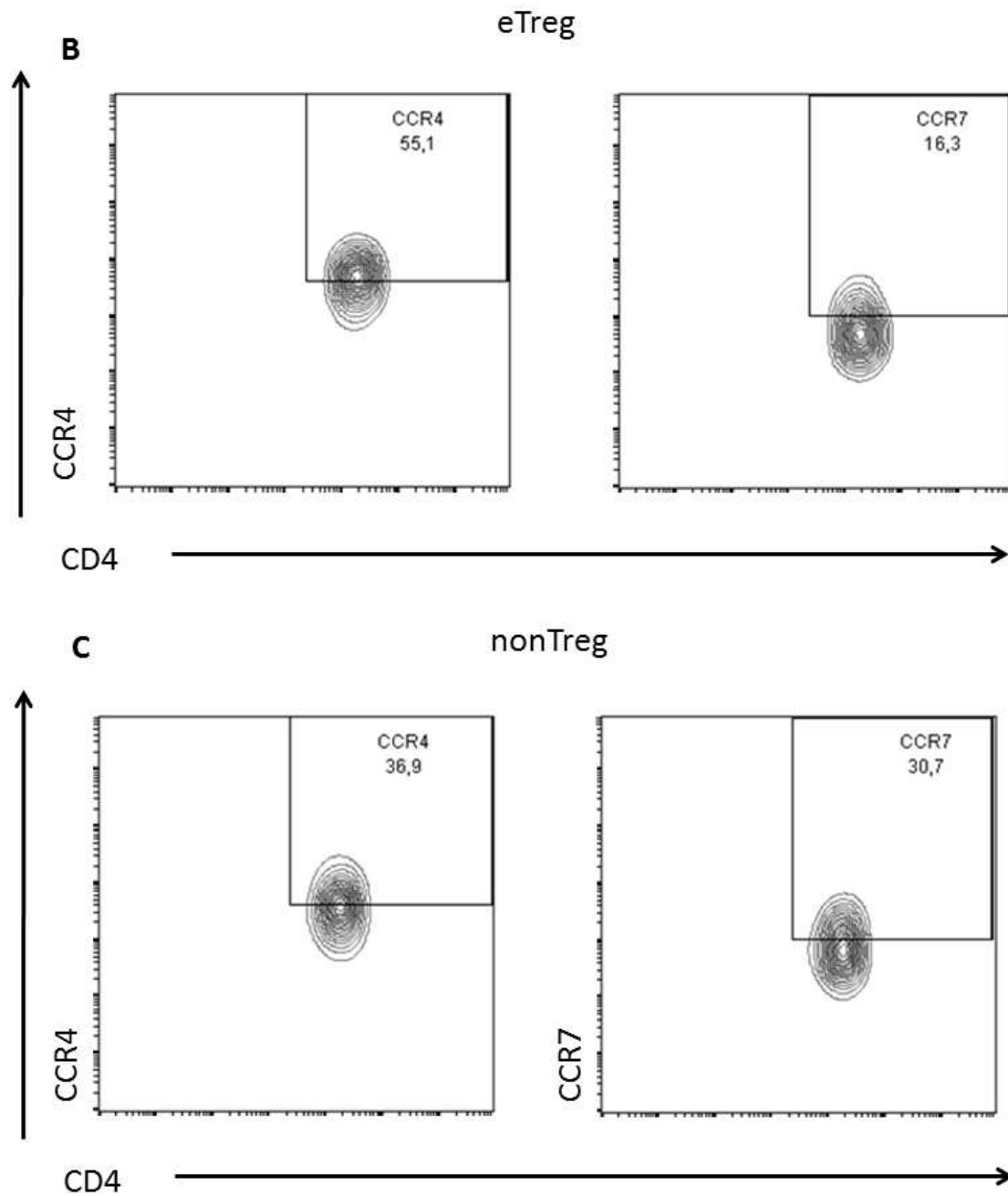


Figure 2S: Representative plots of CCR4 and CCR7 expression in $CD4^+FOXP3^{Low}CD45RA^+$ cells (naïveTreg) (A), $CD4^+FOXP3^{high}CD45RA^-$ cells (eTreg) (B) and $CD4^+FOXP3^{Low}CD45RA^-$ cells (nonTreg) (C).

**ANEXO A - SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY
INDEX - SLEDAI**

Factor de ponderação	SLEDAI SCORE	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8		Convulsão	Instalação recente excluindo causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8		Psicose	Alteração da função mental normal devido a alterações graves da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, associações livres, empobrecimento do conteúdo do pensamento, pensamento marcadamente ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatónico. Excluir uremia e causas farmacológicas/drogas
8		Síndrome órgão-cerebral	Função mental alterada com alteração da orientação, memória ou outra função intelectual com rápida instalação e flutuação dos achados clínicos incluindo obnubilação da consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de manter a atenção ao ambiente envolvente, mais pelo menos duas das seguintes: distúrbios da percepção, discurso incoerente, insónia ou sonolência diurna, aumento ou decréscimo da actividade psicomotora Excluir causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8		Distúrbios visuais	Alterações da retina ligados ao LES, incluindo corpos coróides, hemorragias retinianas, exsudado seroso ou hemorragia no coróide ou nevrite óptica Excluir HTA ou causa infecciosa ou

			causada por drogas
8		Distúrbios nos pares cranianos	Instalação recente de neuropatia sensitiva ou motora atingindo os pares cranianos
8		Cefaleia lúpica	Cefaleia severa, persistente; pode ser tipo migranoso mas deve ser resistente à terapêutica narcótica
8		AVC	Instalação recente de AVC Excluir arteriosclerose
8		Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungueal, hemorragias sub-ungueais, ou biópsia ou angiograma compatíveis com vasculite
4		Artrite	Mais de duas articulações com dor e sinais inflamatórios
4		Miosite	Dor/fraqueza muscular proximal, associado com elevação da CK/aldolase ou eletromiografia ou biópsia compatível com miosite
4		Cilindros urinários	Cilindros de Eritrócitos ou de granuloso
4		Hematúria	> 5 células por campo. Excluir litíase, infecção ou outra causa
4		Proteinúria	> 0.5g/24h. Instalação recente ou aumento > 0.5g/24h
4		Piúria	> 5 leucócitos por campo. Excluir, infecção
2		Novo rash	Instalação recente ou recorrência de rash tipo inflamatório
2		Alopécia	Instalação recente ou recorrência de perda anormal difusa ou localizada de cabelo
2		Ulcerações nasais	Instalação recente ou recorrência de ulcerações nasais
2		Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural derrame ou espessamento

			pleural
2		Pericardite	Dor pericárdica mais pelo menos um dos seguintes: atrito, derrame, ou confirmação eletrocardiográfica ou por ecocardiograma
2		Hipocomplementémia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
2		Aumento do DNA	>25 % no ligando pelo ensaio de Farr ou acima dos valores de referência do laboratório
1		Trombocitopénia	<100.000 plaquetas/mm ³
1		Leucopénia	<3.000 leucocitos/mm ³ Excluir causas farmacológicas
1		Febre	>38° C excluir causa infecciosa
		SCORE SLEDAI TOTAL (1-105)	