

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
TESE DE DOUTORADO**

**PERFIL DE CÉLULAS T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ E
CÉLULAS B CD3⁻CD19⁺ EM PACIENTES COM SÍNDROME
ANTIFOSFOLIPÍDICA PRIMÁRIA E
SECUNDÁRIA**

ESTER ROSÁRI RAPHAELLI DAL BEN

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA
TESE DE DOUTORADO**

ESTER ROSÁRI RAPHAELLI DAL BEN

**PERFIL DE CÉLULAS T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ E
CÉLULAS B CD3⁻CD19⁺ EM PACIENTES COM SÍNDROME
ANTIFOSFOLIPÍDICA PRIMÁRIA E
SECUNDÁRIA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul para a obtenção do título de Doutor
em Medicina e Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Henrique Staub
Co-orientador: Prof. Dr. Moisés Bauer

Porto Alegre, 2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO

D136p Dal Ben, Ester Rosári Raphaelli

Perfil de células T CD4⁺ CD25⁺ Fox P3⁺ e linfócitos B CD3⁻ CD19⁺ na síndrome antifosfolipídica primária e secundária / Ester Rosári Raphaelli Dal Ben. Porto Alegre: PUCRS, 2012.

120f.: gráf.; il. tab. Inclui dois artigos científicos: um aceito e outro submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Henrique L. Staub.

Co-orientador: Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. SÍNDROME ANTIFOSFOLIPÍDICA. 2. TROMBOFILIA AUTOIMUNE. 3. LINFÓCITOS T REGULADORES. 4. CÉLULAS B. 5. LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO. 6. DOENÇAS AUTO IMUNES. 7. ESTUDO TRANSVERSAL CONTROLADO. I. Staub, Henrique L. II. Bauer, Moisés Evandro. III. Título.

CDD 616.079

CDD 616.94 (043 7)

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

*Aos que compartilharam meus ideais,
incentivando-me a prosseguir nesta jornada.
Aos que, pelo amor se fizeram presentes.
Aos que, mesmo distantes, me encheram de força.
Aos que, através do exemplo, lições e
lembranças me deram direção.*

Aos meus amores: César, Eduardo e Nathan.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Henrique L. Staub, meu orientador, pelo incentivo, pela paciência, preciosas orientações e, acima de tudo, pela oportunidade de participar deste programa de Pós-graduação, tornando realidade um sonho de muitos anos;

Ao Prof. Dr. Moisés E. Bauer, meu co-orientador, pela oportunidade de fazer parte, durante estes anos, da maravilhosa equipe do Laboratório de Imunologia do Envelhecimento/Instituto de Pesquisas Biomédicas (PUCRS), pelo incentivo, pelo imenso aprendizado que resultou desta convivência, sem o qual esta pesquisa não teria sido possível;

Aos pacientes do ambulatório de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS e voluntários que, atenciosamente, aceitaram participar desta pesquisa. Sem eles, este estudo seria, ainda, apenas um projeto;

Ao pessoal do laboratório de Imunologia do Envelhecimento, Carine H. do Prado, Talita S. A. Baptista, Andréia Wieck, Laura Petersen, Lucas Rizzo, Suyan Ribeiro e Júlia Motta, pela colaboração e amizade durante esta caminhada;

Aos residentes da Reumatologia, Claudine Predebon Morsch, Fábio Batistella e Ronaldo Nunes Godinho que, semanalmente, selecionaram os pacientes desta pesquisa;

A Raquel Torcato e Cínara Ribeiro, técnicas de enfermagem do ambulatório de Pediatria do Hospital São Lucas (PUCRS) que, gentilmente, efetuaram as coletas de sangue dos pacientes;

Aos professores que, ao longo destes anos, contribuíram com sugestões e orientações, enriquecendo este trabalho;

Ao Dr. Cristiano Silveira e Silva, que realizou os exames laboratoriais complementares nos participantes desta pesquisa;

À minha querida amiga e colega de doutorado, Dr^a Rosemary Pinheiro, que dividiu comigo as angústias e incertezas deste período, tendo sido um ponto de apoio e uma sempre carinhosa fonte de incentivo;

À Direção e Supervisão da CNEC/Arroio dos Ratos pela compreensão demonstrada nestes anos, pela paciência e boa vontade em organizar meus horários, de forma a estar disponível para realizar esta pesquisa;

Às senhoras Ondina Mattos e Maria de Lourdes Dias pela colaboração e cordialidade demonstradas nestes anos.

*“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência.
E, para se chegar, onde quer que seja, aprendi que
não é preciso dominar a força, mas a razão.
É preciso, antes de mais nada, querer”
A. Klink*

RESUMO

Introdução: A síndrome antifosfolípídica (SAF) é uma trombofilia autoimune caracterizada por trombose arterial e/ou venosa, morbidade gestacional e presença de anticorpos antifosfolípidos. As células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ desempenham importante papel no controle supressivo da resposta imune, sendo sua hipofunção associada à autoimunidade. Por sua vez, os linfócitos B, além de se comportarem como células autorreativas, podem deflagrar a produção de células Treg.

Objetivo: Quantificar, originalmente, células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e linfócitos B CD3⁻CD19⁺ em pacientes com SAF primária e secundária comparativamente a controles saudáveis.

Materiais e métodos: O estudo, transversal controlado, incluiu a análise fenotípica de células mononucleares de sangue periférico nos três grupos de indivíduos acima mencionados; as células foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD4 FITC, CD25 APC, FoxP3 PE, CD3 CY5 e CD19 PE e quantificadas por citometria de fluxo.

Resultados: Vinte e cinco pacientes com SAF primária, 25 com SAF secundária a lúpus eritematoso pareados por sexo e idade e 25 controles saudáveis participaram deste estudo. O valor encontrado, percentual e absoluto, de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e de células B CD3⁻CD19⁺ nos pacientes com SAF primária foi significativamente menor quando comparados a controles saudáveis ($P < 0,05$). No grupo com SAF secundária, as células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD3⁻CD19⁺ também estiveram significativamente diminuídas em relação aos controles ($P < 0,05$). O teste de Pearson revelou correlação negativa entre número de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e SLEDAI em pacientes com SAF secundária ($r_s = -0,75$, $P < 0,05$); não houve associação entre número de células Treg e uso de azatioprina ($P = 0,23$), glicocorticóides ($P = 0,29$) e cloroquina ($P = 0,12$).

Conclusão: Pacientes com SAF primária ou secundária tiveram definida depleção de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, o que pode ter contribuído para os fenômenos autoimunes vistos na doença. A diminuição do número de células B CD3⁻CD19⁺ nestes pacientes deve ser elucidada em estudos futuros.

ABSTRACT

Introduction: Antiphospholipid syndrome (APS) is characterized by venous or arterial thromboses, fetal losses and thrombocytopenia, in the presence of antiphospholipid antibodies (aPL). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cell dysfunction has been documented in various autoimmune disorders, but not in antiphospholipid syndrome (APS) up to date. **Methods:** In this cross-sectional study, we aim to investigate CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and CD3⁻CD19⁺ B cells in patients with primary APS, APS secondary to systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls. Cell subtypes were immunophenotyped using specific monoclonal antibodies (anti-CD3 CY5, anti-CD4 FITC, anti-CD25, anti-Foxp3, anti-CD19 PE) and flow cytometry. **Results:** Twenty and five patients with primary APS, 25 with APS secondary to SLE and 25 age- and sex-matched controls were studied. The percentage Treg cells and CD3⁻CD19⁺ B cells were found significantly lower in primary APS and APS secondary to SLE patients as compared to controls (all $p < 0.05$). Decreasing levels of circulating Treg cells correlated to higher scores of lupus activity ($r = -0.75$, $p < 0.0001$). Number of circulating Treg cells did not significantly vary among users or nonusers of chloroquine, azathioprine and corticosteroids ($p = 0.90$, $p = 0.76$ and $p = 0.29$, respectively). **Conclusion:** A dysfunction in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells may represent one of the mechanisms leading to autoimmunity in APS patients. The decreased number of CD3⁻CD19⁺ B cells of APS patients warrants further elucidation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Manifestações clínicas associadas aos anticorpos antifosfolipídicos.....	15
Tabela 2: Especificidades dos antígenos detectados no soro de pacientes com síndrome antifosfolipídica.....	17
Tabela 3: Critérios de classificação revisados para síndrome antifosfolipídica.....	21
Tabela 4: Manifestações clínicas da síndrome antifosfolipídica.....	23
Tabela 5: Critérios do Colégio Americano de Reumatologia para a classificação do lúpus eritematoso sistêmico.....	28
Tabela 6: Índice de atividade da doença no LES-SLEDAI.....	29
Tabela 7: Marcadores para células T reguladoras.....	36
Tabela 8: Características demográficas, clínicas e laboratoriais entre pacientes com síndrome antifosfolipídica primária e secundária.....	57
Tabela 9: Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos na síndrome antifosfolipídica primária e controles.....	58
Tabela 10: Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos na síndrome antifosfolipídica secundária e controles.....	61
Tabela 11: Distribuição de medicamentos em pacientes com síndrome antifosfolipídica primária e secundária.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos patogênicos na síndrome antifosfolipídica.....	20
Figura 2: Tolerância central e periférica a antígenos próprios.....	33
Figura 3: Dinâmica de diferenciação de células T CD4 ⁺ em células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	37
Figura 4: Modelos de mecanismos de ação das Treg.....	39
Figura 5: Estratégia de separação das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	59
Figura 6: Marcação de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ em pacientes com síndrome antifosfolipídica primária e controles.....	59
Figura 7: Representação da marcação de células CD3 ⁻ CD19 ⁺ em pacientes com síndrome antifosfolipídica primária e controles.....	60
Figura 8: Distribuição gráfica percentual de linfócitos totais, células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ e células B CD3 ⁻ CD19 ⁺ em controles e pacientes com síndrome antifosfolipídica primária.....	60
Figura 9: Marcação característica de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ em pacientes com síndrome antifosfolipídica secundária e controles.....	62
Figura 10: Marcação de células B CD3 ⁻ CD19 ⁺ em pacientes com síndrome antifosfolipídica secundária e controles.....	63

Figura 11: Distribuição gráfica percentual de linfócitos totais, células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e células B CD3⁻CD19⁺ em controles e pacientes com síndrome antifosfolipídica secundária.....63

Figura 12: Relação entre percentual de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e índice de atividade de doença no LES (SLEDAI).....63

LISTA DE ABREVIATURAS

AAF	anticorpos antifosfolipídicos
aCL	anticorpo anticardiolipina
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AIRE	gene regulador autoimune
AIT	acidente isquêmico transitório
AL	anticoagulante lúpico
ANA	anticorpos antinucleares
ANCA	anticorpo anticitoplasma de neutrófilo
ANCOVA	análise de co-variância
AR	artrite reumatoide
AVC	acidente vascular cerebral
β_2 GPI	beta2 glicoproteína I
CAA	células apresentadoras de antígenos
CG	centro germinativo
CMSP	células mononucleares de sangue periférico
DNA	ácido desoxirribonucleico
NOD	diabéticos não obesos
EM	esclerose múltipla
ES	esclerose sistêmica
EVH	enxerto <i>versus</i> hospedeiro
GITR	receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno leucocitário humano
IFN- γ	interferon-gama
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IL-2	interleucina-2
IL-7	interleucina-7
IL-10	interleucina-10
IPEX	desregulação imune:poliendocrinopatia enteropatia ligada ao cromossomo X
LES	lúpus eritematoso sistêmico
MIF	média de intensidade de fluorescência
MPO	mieloperoxidase
PCR	reação em cadeia da polimerase
PTI	púrpura trombocitopênica
RCB	receptor de célula B
RCT	receptor de célula T
RNA	ácido ribonucleico
SAF	síndrome antifosfolipídica
SARA	síndrome da angústia respiratória aguda
SLEDAI	índice de atividade de doença no lúpus eritematoso sistêmico
SNC	sistema nervoso central
SSp	síndrome de Sjögren primária

TGF- β
TNF- α
VDRL

fator de crescimento em transformação-beta
fator de necrose tumoral-alfa
referência laboratorial para doença venérea(sífilis)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Síndrome antifosfolípídica	14
1.2 Epidemiologia e etiologia	15
1.3 Patogênese e fisiopatologia	18
1.4 Critérios diagnósticos	20
1.5 Manifestações clínicas	22
1.6 Síndrome Antifosfolípídica Catastrófica	24
1.7 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)	25
1.8 Índices de atividade da doença	28
1.9 Tolerância e autoimunidade	31
1.10 Células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	34
1.11. Dinâmica de diferenciação das células T CD4 ⁺ em células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	36
1.12 Mecanismos de ação de células T reguladoras	38
1.13 Células T reguladoras e doenças autoimunes	39
1.14 Células B	45
1.15 Papel das células B em doenças autoimunes	47
2 JUSTIFICATIVA	48
3 HIPÓTESES	50
4 OBJETIVO	50
5 MATERIAIS E MÉTODOS	51
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55

7 RESULTADOS	56
8 DISCUSSÃO	65
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
10 CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DE ARTIGO AO <i>JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY</i>	89
11 DECISÃO EDITORIAL DO JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY	90
12 ARTIGO ACEITO NO JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY	91
13 CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DE ARTIGO AO <i>IMMUNOLOGY LETTERS</i>	104
14 ARTIGO SUBMETIDO AO <i>IMMUNOLOGY LETTERS</i>	105
15 APÊNDICE	115
15.1 Termo de Aprovação do Comitê Científico	115
15.2 Termo de Aprovação do Comitê de Ética	116
15.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	117
15.4 Questionário aplicado aos controles	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome antifosfolípídica

A síndrome antifosfolípídica (SAF) é uma trombofilia sistêmica autoimune caracterizada por trombose arterial e/ou venosa, morbidade gestacional e títulos elevados de anticorpos antifosfolípidos (AAF); os últimos incluem o anticoagulante lúpico (AL), anticorpos anticardiolipina (aCL) e anticorpos dirigidos contra cofatores fosfolípidos, principalmente beta-2-glicoproteína I (β_2 GPI) (1-2).

A SAF foi descrita originariamente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e, nos últimos 20 anos, o envolvimento multiorgânico tem sido reconhecido (3).

Os anticorpos antifosfolípidos, e raramente a SAF, podem ser induzidos por drogas e por infecções (4). A SAF ocorre em pacientes sem outros diagnósticos (SAF primária) e em pacientes que também apresentam LES ou outras doenças reumáticas (SAF secundária). Resultados anormais (positivos) para AAF podem preceder os sintomas por muitos anos.

Tem sido relatada a associação de AAF com doenças autoimunes ou reumáticas, malignidades, doenças hematológicas, infecções, doenças neurológicas e drogas (5). A tabela 1 lista várias manifestações clínicas associadas a esses anticorpos.

Tabela 1: Manifestações clínicas associadas aos anticorpos antifosfolipídicos

Doenças imunológicas	Lúpus eritematoso sistêmico (25-50%), púrpura trombocitopênica idiopática (30%), artrite reumatoide (33%), artrite psoriática (28%), síndrome de Sjögren (42%), arterite de células gigantes/polimialgia reumática (20%), doença mista do tecido conjuntivo (22%), esclerose sistêmica (25%), doença de Behçet (20%), poliartritenodosa, dermatomiosite/polimiosite, anemia hemolítica autoimune, hepatite crônica ativa. * As porcentagens entre parênteses representam pacientes com AAFs, e não necessariamente a presença de manifestações clínicas da SAF.
Malignidade	Tumores sólidos, leucemia, desordens linfoproliferativas/ doença de Hodgkin, mieloma múltiplo, micose fungoide.
Doenças hematológicas	Mielofibrose, doença de von Willebrand, paraproteinemias.
Doenças infecciosas	Sífilis, hanseníase, tuberculose, micoplasma, doença de Lyme, malária, infecção pelo HIV, hepatite A, hepatite C, HTLV-1, mononucleose, adenovirose, parvovirose, sarampo, varicela, caxumba, infecções bacterianas (endocardite e sepsis).
Doenças neurológicas	Síndrome de Sneddon, <i>miastenia gravis</i> , esclerose múltipla, enxaqueca (hemicraniana)
Medicações	Clorpromazina, fenitoína, hidralazina, procainamida, quinidina, clozapina, estreptomicina, fenotiazidas

Nahass GT (5)

1.2 Epidemiologia e Etiologia

Baixas concentrações de aCL são mensuráveis em indivíduos normais. Baixos títulos de aCL ocorrem entre 2 a 6,5% de doadores de sangue saudáveis e títulos

moderados a altos de aCL ou AL são encontrados em 0,2 % da população. A prevalência de testes positivos aumenta com a idade. De 60 a 80% dos pacientes com SAF primária são mulheres. A doença familiar é frequente. A presença do anticorpo isotipo IgA em pacientes com antepassados africanos é mais provável do que em pacientes com antepassados europeus (6-7).

A frequência da SAF na população em geral é desconhecida. Há uma predominância da doença no sexo feminino principalmente na SAF secundária. Permanece a associação de SAF com LES e outras doenças do tecido conjuntivo, onde existe a predominância do sexo feminino (8). Não há predominância de raça na SAF (9). Esta doença ocorre comumente em jovens e adultos de meia-idade, mas pode se manifestar em crianças e idosos. Existe relato de SAF em crianças com menos de oito meses de idade (9).

Em estudo envolvendo médicos sadios acompanhados prospectivamente por três anos, aqueles com títulos moderados ou altos de anticorpos IgG aCL têm um risco oito vezes maior para tromboflebitas ou embolia pulmonar que os indivíduos com testes negativos (10). Aproximadamente 10% das vítimas de um primeiro acidente vascular cerebral (AVC) têm AAF, especialmente se são jovens, assim como 14% das mulheres que tenham sofrido três ou mais perdas fetais consecutivas (11). Polimorfismos da β_2 -GPI influenciam na geração de AAF, mas pessoas com ausência congênita da β_2 -GPI parecem normais (12).

Os mecanismos deflagradores de síntese de AAF e, como consequência, SAF, ainda não são definitivamente conhecidos. Em modelos animais, imunização passiva ou ativa com peptídeos virais (13), heterólogos da β_2 -GPI (14), autoanticorpos anti-idiotipo (15), induziram AAF, trombocitopenia e reabsorção fetal. A tabela 2 decreve a especificidade de antígenos detectados no soro de pacientes com SAF.

Tabela 2: Especificidades dos antígenos detectados no soro de pacientes com síndrome antifosfolipídica (SAF)

Antígenos/ Complexos de antígenos
Fosfolipídios
Fosfolipídios aniônicos (cardiolipina, fosfatidilserina)
Fosfolipídios zwitteriônicos (fosfatidil etanolamina)
Componentes e reguladores da coagulação e fibrinólise
β_2 glicoproteína I
Protrombina
Trombina
Antitrombina III / complexo antitrombina
Fator tecidual / complexo do fator VIIa
Cinogênicos de alto e baixo peso molecular
Pré-caliceína
Proteína Z / sistema de inibição de protease da proteína Z
Proteína C
Proteína S
Trombomodulina
Tecido ativador de plasminogênio
Anexina V
Lipoproteínas
Lipoproteínas oxidadas de baixa densidade
Lipoproteínas de alta densidade
Apolipoproteína A-I

Mackworth-Young CG (16)

A SAF pode contribuir para o aumento na frequência de AVC, especialmente em indivíduos jovens, bem como a ocorrência de infarto do miocárdio (17). Doença

cardíaca valvular pode ser mais agressiva, requerendo troca de válvula (18). Embolia ou trombose pulmonar recorrente pode levar à hipertensão pulmonar (18).

A SAF catastrófica é uma manifestação séria e comumente fatal, com índice de mortalidade de aproximadamente 50%, caracterizada por infartos em vários órgãos em período que podem variar de dias a semanas (19).

Em relação à SAF obstétrica, abortamentos e perdas fetais são eventos bem documentados (20). Uma associação entre presença de anticorpos aCL em níveis moderados a altos e ocorrência de pré-eclâmpsia foi recentemente documentada em estudo de revisão sistemática com metanálise (21).

1.3 Patogênese e Fisiopatologia

Considerando-se a ocorrência persistente de altos títulos de AAF durante anos em pessoas assintomáticas, é provável que o dano vascular ou ativação celular preceda imediatamente à trombose clínica. Este fato relaciona-se com a migração de fosfatidilserina para o exterior da membrana celular durante a ativação ou apoptose de plaquetas, células endoteliais e trofoblastos. A β_2 -GPI circulante liga-se à fosfatidilserina e os AAF ligam-se à β_2 -GPI, induzindo a adesão molecular e trombooses (22). AAF “normais” podem induzir apoptoses e, a β_2 -GPI parece funcionar como parte de um mecanismo normal para eliminação de células apoptóticas (23). *In vitro*, AAF aumentam a aderência de leucócitos em movimento ao endotélio (24); *in vivo*, causam tanto a

reabsorção fetal, como aumentam o tamanho e a duração do trauma induzido pelo trombo arterial (25-26). Na placenta, AAF competem com um anticoagulante natural, anexina V (anticoagulante placentário), em lugar dos fosfolípidios, permitindo, desse modo, que ocorra a trombose intraplacentária (27).

Deficiências hereditárias de proteína C, proteína S e antitrombina III ou, ainda, presença de mutação do fator V de Leiden podem aumentar o risco de trombose em pacientes com AAF. AAF se ligam a lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento de aterosclerose (28). Uma função de AAF “normal” parece envolver a remoção fisiológica de lipídios oxidados.

Entre os vários mecanismos propostos, dos quais os AAF podem ser produzidos (24, 29-30), podemos citar:

1. Autoimunidade;
2. AAF representando resposta imune contra antígenos da membrana interna (como a fosfatidilserina) expostos por células em apoptose;
3. AAF funcionando como anticorpos de reação cruzada contra antígenos virais ou microbianos.

A figura 1 ilustra os prováveis mecanismos patogênicos da síndrome antifosfolipídica.

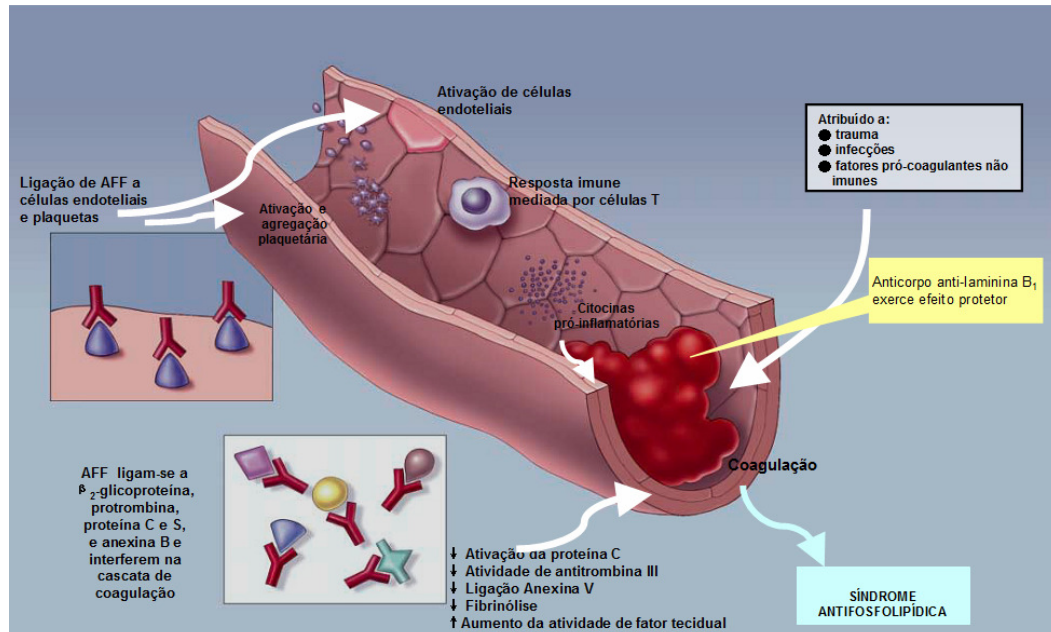


Figura 1: Mecanismos patogênicos da síndrome antifosfolípídica
 Adaptado de Hanly, 2003 (30)

1.4 Critérios diagnósticos

O diagnóstico da SAF é dependente de alta suspeição clínica e confirmação por meio de parâmetros laboratoriais. Quando trombozes arteriais ou venosas ocorrem em pacientes que não possuem fatores de risco óbvios para trombose ou quando eventos trombóticos são recorrentes, deve-se considerar SAF (31). Entretanto, o diagnóstico pode ser difícil devido à grande variedade de manifestações clínicas e dificuldades laboratoriais referentes a técnicas de detecção e padronização de resultados. Além disso, os níveis de AAF podem aumentar, diminuir ou eventualmente desaparecer no decorso da doença (32).

O diagnóstico desta doença está baseado em critérios clínicos (eventos trombóticos e morbidade gestacional) e laboratoriais. Este último critério inclui títulos

moderados ou altos de aCL ou anti- β_2 -GPI ou presença de AL, em duas ou mais ocasiões com 12 semanas de intervalo. A tabela 3 mostra o Consenso Internacional de 2006 para a classificação da SAF.

Tabela 3: Critérios de classificação revisados para síndrome antifosfolipídica (SAF)

Critérios clínicos (um ou mais)

1. Trombose vascular: um ou mais episódios clínicos de trombose arterial, venosa ou de pequenos vasos, ocorrendo em qualquer tecido ou órgão confirmado por Doppler ou exame histopatológico. A histopatologia deve excluir vasculite.
2. Morbidade gestacional
 - a) Uma ou mais mortes de feto morfologicamente normal com mais de 10 semanas de idade gestacional.
 - b) Um ou mais nascimentos prematuros de feto morfologicamente normal com 34 semanas ou menos em virtude de pré-eclâmpsia, eclâmpsia ou retardo no crescimento uterino.
 - c) Três ou mais abortamentos espontâneos antes de 10 semanas de idade gestacional, excluídas causas cromossomiais ou maternas.

Critérios laboratoriais (um ou mais)

1. Anticorpo anticardiolipina: anticorpo anticardiolipina IgG e/ou IgM em títulos moderados a altos (> 20 unidades), em duas ou mais ocasiões, com intervalo de no mínimo seis semanas. O teste deve ser ELISA padronizado.
 2. Anticorpo anticoagulante lúpico: anticoagulante lúpico presente no plasma, detectado de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia.
 3. Anticorpo anti- β_2 glicoproteína: anticorpo anti- β_2 glicoproteína IgG e/ou IgM no soro ou plasma em títulos superiores ao 99º percentil, presentes em duas ou mais ocasiões, com intervalo de no mínimo 12 semanas, medidos por ELISA (procedimento padronizado).
-

Miyakis S et al (2)

O diagnóstico definitivo da SAF requer pelo menos um critério clínico e um laboratorial, não havendo limites de intervalo entre o evento clínico e o achado laboratorial.

1.5 Manifestações Clínicas

As principais manifestações clínicas da SAF são trombozes arteriais e venosas recorrentes. A trombose venosa, particularmente em membros inferiores (33), ocorre em mais de 55% dos pacientes dos SAF (34). Outros locais acometidos incluem as veias renais, retinianas e hepáticas (33). A trombose arterial envolve o cérebro em mais de 50% dos casos, causando acidentes isquêmicos transitórios (AIT) e acidentes vasculares cerebrais (AVC); aproximadamente 90% dos pacientes abaixo de 50 anos com AIT apresentam AAF positivos (34). Outros locais de trombose arterial incluem o coração, olhos, rins e artérias periféricas (34-35). Na SAF, os episódios de trombose podem ocorrer em leitos vasculares infrequentemente afetados por outros estados pró-trombóticos (34).

Complicações obstétricas podem estar associadas à SAF, incluindo abortamentos (principalmente no final do primeiro trimestre), morte fetal (no segundo e no terceiro trimestres de gestação), pré-eclâmpsia, retardo do crescimento intrauterino e síndrome de HELLP. A perda fetal após 10 semanas de gestação é característica de portadores de SAF, contrastando com a que se verifica na população em geral, em que os abortos são mais frequentes durante as nove primeiras semanas de gestação (35) e associados a diferentes causas (36).

O espectro de manifestações clínicas da SAF é bastante amplo; há predomínio de microangiopatia trombótica ou isquemia secundária a eventos tromboembólicos (37).

A tabela 4 descreve as manifestações clínicas da SAF.

Tabela 4: Manifestações clínicas da síndrome antifosfolipídica

Sistema orgânico	Processo patogênico primário*	
	Tromboembolismo de grandes vasos	Microangiopatia trombótica
Arterial	Trombose de aorta ou artérias: carótida, axilar, hepática, íleofemoral, mesentérica, pancreática, poplítea, esplênica ou subclávia	
Cardíaco	Angina, infarto agudo do miocárdio, vegetações de válvulas cardíacas, anormalidades valvulares, trombo intracardíaco, endocardite trombótica não bacteriana (Libman-Sacks), embolização periférica ou aterosclerose	Infarto do miocárdio, miocardite ou anormalidades valvulares
Cutâneo	Tromboflebite superficial, hemorragias em estilhaço (<i>splinter</i>), úlceras de perna, isquemia cutânea distal, infartos da pele, síndrome do dedo azul ou acrocianose	Livedo reticular, gangrena superficial, púrpura, equimoses ou nódulos subcutâneos
Endócrino ou reprodutivo	Infarto ou falência adrenal, infarto testicular, infarto da próstata, necrose ou falência da glândula pituitária	
Gastrointestinal	Síndrome de Budd-Chiari, infarto hepático, intestinal ou esplênico, perfuração esofágica, colite isquêmica, infarto da vesícula biliar não atribuído a cálculos, pancreatite ou ascite	Infarto ou gangrena do intestino, fígado, pâncreas ou baço
Hematológico	Trombocitopenia, anemia hemolítica, síndrome hemolítico-urêmica ou púrpura trombocitopênica trombótica	Coagulação vascular disseminada
Neurológico	Ataque isquêmico transitório, acidente vascular cerebral (trombótico ou embólico), coreia, convulsões, demência por múltiplos infartos, mielite transversa, encefalopatias, enxaqueca, pseudotumor cerebral, trombose venosa cerebral, amaurose fugaz ou mononeurite múltipla	Microtrombos ou microinfartos
Obstétrico	Aborto ou morte fetal, crescimento intrauterino retardado, síndrome de HELLP, oligodrâmio, pré-eclâmpsia	

	ou insuficiência uteroplacentária	
Oftalmológico	Trombose da artéria ou veia retiniana, ou amaurose fugaz	Retinite
Pulmonar	Embolia pulmonar, hipertensão pulmonar, hemorragia alveolar ou trombose arterial pulmonar	Hemorragia alveolar ou síndrome da angústia respiratória
Renal	Trombose da artéria ou veia renal, infarto renal, hipertensão, insuficiência renal aguda ou crônica, proteinúria, hematúria ou síndrome nefrótica	Insuficiência renal aguda, microangiopatia trombótica ou hipertensão
Venoso	Trombose venosa profunda, trombose de veias adrenal, hepática, mesentérica, porta, esplênica ou cava inferior	
Miscelânea	Perfuração do septo nasal ou necrose avascular de ossos	

Levine et al (37)

* Muitas manifestações clínicas da síndrome antifosfolipídica podem resultar de tromboembolismo de grandes vasos, microangiopatia trombótica ou de ambos. Por conveniência, apenas aquelas resultantes exclusivamente de microangiopatia trombótica ou que constituam a característica principal são listadas na coluna microangiopatia trombótica.

♦ Manifestações da síndrome antifosfolipídica cuja patogenia é incerta (por exemplo, trombocitopenia) são listadas na coluna de tromboembolismo de grandes vasos.

1.6 Síndrome antifosfolipídica catastrófica

A SAF catastrófica é uma manifestação rara da SAF ocorrendo em menos de 1% dos casos (38); caracteriza-se pela trombose de três sítios distintos num período de até uma semana, na presença de anticorpos antifosfolípidos. Caso seja possível obter uma amostra de tecido demonstrando trombo intravascular, conclui-se definitivamente o diagnóstico de SAF catastrófica, pois tende a acometer a microcirculação de órgãos nobres (39). A SAF catastrófica pode ser a apresentação inicial da SAF em até 75% dos casos.

A principal manifestação clínica é a insuficiência renal, que em 78% dos casos, pode-se apresentar com quadro de hipertensão arterial maligna, onde os pacientes necessitam de diálise em 25% dos casos. Em seguida, a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) é a manifestação mais prevalente, ocorrendo em 66% dos casos, bem como o AVC (56%) e a necrose cutânea (50%); disfunção miocárdica ocorre também em 50% dos casos (19). A mortalidade na SAF catastrófica chega a 50%, mas graças à terapêutica combinada com anticoagulação, corticosteróides em forma de pulsoterapia e plasmaférese ou imunoglobulina intravenosa, a taxa de mortalidade global tem diminuído na última década e é agora cerca de 30% (40).

Entre os fatores precipitantes da SAF catastrófica, destacam-se infecções, retirada da anticoagulação, procedimentos endovasculares e cirurgias, sendo aqueles mais importantes e que devem ser sempre procurados (41).

1.7 Lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo, crônica, que pode afetar virtualmente qualquer órgão. Como ocorre em outras doenças autoimunes, a resposta imune se volta contra células e tecidos próprios, resultando em inflamação e dano tecidual (42-43)

O LES pode ocorrer em qualquer idade, mas tem seu início principalmente entre as idades de 16 e 55 anos. Ocorre com maior frequência entre mulheres, numa

proporção, nesta faixa etária, de nove a dez mulheres para cada homem, com uma prevalência variando 14 a 50/100.000 habitantes em estudos norte-americanos. Com relação a etnias, entre os grupos estudados, verificou-se uma maior prevalência entre afroamericanos. As mulheres afro-americanas e hispânicas são afetadas com maior frequência do que as brancas e geralmente apresentam a doença na forma mais grave (44-45). Estudos apontam uma incidência entre 0,36 e 0,53 por 100.000 casos/ano variável de acordo com as regiões e grupos étnicos. Alguns estudos demonstram que o LES corresponde a 1% das doenças reumatológicas em pediatria no Reino Unido, 1,5% a 3% no Canadá e 4,5% nos EUA (46-47).

No Brasil, um estudo realizado por Vilar, Rodrigues e Sato estimou a incidência de 8,7/100.000 habitantes na cidade de Natal (RN) no ano 2000. A doença parece ser mais comum na zona urbana do que na zona rural (48).

O LES é uma doença rara antes dos oito anos de idade; é mais frequente no sexo feminino (4:1 antes da puberdade, aumentando para 8:1 a partir desta idade) e mais grave quando se inicia na infância (47). Em 65 % dos pacientes com LES, a doença teve início antes dos 16 anos, 55,2% após os 16 anos e 15 % antes dos 55 anos (49).

Devido a sua natureza sistêmica, as manifestações clínicas do LES são diversas, sendo principalmente envolvidos pele, articulações, rins, serosas, sistema nervoso e sangue. Estas manifestações ocorrem em variada extensão nos pacientes e, podem

mudar no decorrer do tempo. Os sintomas da doença geralmente são inespecíficos e incluem artralgias, mialgias, náuseas, vômitos, cefaleia, depressão, emagrecimento e febre, variavelmente combinados. Podem se apresentar de forma leve ou grave, intermitente ou persistente (43, 50).

A morbidade da doença é potencialmente alta e pode ser representada, sobretudo, pelo comprometimento renal, que ocorre em um percentual considerável de pacientes durante o curso da doença. A nefrite lúpica e o envolvimento neurológico constituem as principais causas de mortalidade na primeira década da doença (50-51).

A sobrevida tem aumentado significativamente e a principal causa de morte é aterosclerose prematura, com risco 50 vezes maior de infarto do miocárdio do que a população sadia. Os pacientes com LES apresentam acelerada aterosclerose com sequelas clínicas (52-55). A dislipidemia é comumente associada com o LES e pode se situar como um importante fator na progressão da aterosclerose. Da mesma maneira, o uso de esteroides pode afetar o perfil lipídico e ter um efeito similar na aterosclerose (56-57).

O curso clínico é caracterizado por períodos de remissões e de recaídas agudas ou crônicas. Anormalidades imunes características, especialmente anticorpos dirigidos a vários antígenos nucleares e a outros antígenos celulares, se desenvolvem em pacientes com LES. O diagnóstico é efetuado pela presença de quatro dos onze

critérios clínicos ou laboratoriais elaborados pelo Colégio Americano de Reumatologia em 1982, e revisados em 1997 (58). Estes critérios, descritos na tabela 5, devem estar presentes, seriada ou simultaneamente, durante qualquer intervalo de observação.

Tabela 5: Critérios do Colégio Americano de Reumatologia para classificação do LES

Eritema malar
Lesão discóide
Fotossensibilidade
Úlceras Orais
Artrite não erosiva, de duas ou mais articulações
Serosite: pleurite, pericardite
Renais: proteinúria > 0,5 g/dia, cilindros
Neurológico: convulsão, psicose
Hematológico: anemia hemolítica, leucopenia < 4.000/mm ³ , linfopenia <1.500/mm ³ , plaquetopenia < 100.000/mm ³
Alterações imunológicas: anticorpos antifosfolípides, anticorpos AntiSm, falso VDRL positivo
Anticorpos antinucleares

Hahn BH, 2008(44)

1.8 Índices de atividade da doença

Tão importante quanto o diagnóstico é a definição da atividade da doença. Para a quantificação da atividade da doença, deve ser utilizado um instrumento padronizado, validado, fiável e sensível às mudanças. Para mensurar a atividade da doença e medir a efetividade das diversas modalidades terapêuticas, vários índices foram elaborados. São exemplos o Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (59),

o Systemic Lupus Activity Measure (SLAM) (60), o European Consensus Lupus Activity Measure (ECLAM) (61) ou o British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) (62).

Entre estes índices, o mais utilizado é o SLEDAI, um índice quantitativo de prática aplicação, baseado na presença ou ausência de 24 itens de anormalidades em 9 sistemas orgânicos. Cada ítem recebe pontos, cuja soma pode variar de zero a 105. Este índice deve ser aplicado considerando as anormalidades ocorridas nos últimos dez dias. Assim, este método é mais sensível às mudanças clínico-laboratoriais de atividade da doença. Considera-se doença ativa uma soma maior ou igual a 4, e doença severa uma soma maior que 12. O SLEDAI foi objeto de atualização no ano de 2000 (SLEDAI 2K) (63). A tabela 6 se refere ao conjunto de manifestações observadas no SLEDAI com as respectivas pontuações.

Tabela 6: Índice de atividade da doença no lupus eritematoso sistêmico 2000 (SLEDAI 2K)

Pontuação	Manifestação Observada	Definição
8	Convulsões	Início recente. Excluir causa metabólica, infecciosa ou relacionada com fármacos
8	Psicose	Perturbação grave da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, perda marcada das associações, pensamento pobre, ilógico; comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Exclui uremia ou causa relacionada a fármacos
8	Síndrome orgânica cerebral	Funções mentais alteradas de início súbito e caráter flutuante, com dificuldade na orientação, memória ou outras funções intelectuais. Inclui redução da vigiidade com diminuição ou incapacidade da atenção e pelo menos mais de dois dos seguintes: perturbação da percepção, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, aumento ou diminuição da atividade psicomotora.

		Excluir causas metabólicas infecciosas ou relacionadas com fármacos
8	Distúrbios visuais	Alterações retinianas do LES: corpos citóides, hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragias da coróideia ou neurite óptica (não causada por HTA, fármacos ou infecção)
8	Distúrbios dos nervos cranianos	Neuropatia sensitiva ou motora de novo envolvendo pares cranianos
8	Cefaleia lúpica	Cefaleia severa, persistente, pode ter características de enxaqueca; resistente aos analgésicos narcóticos
8	AVC	Acidente vascular cerebral. Excluir aterosclerose
8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, enfartes periungueais, hemorragias subungueais lineares ou vasculite confirmada por biópsia ou angiografia.
4	Artrite	Dor e sinais inflamatórios (palpação dolorosa, tumefação ou derrame articular) em mais de 2 articulações
4	Miosite	Dor ou fraqueza muscular proximal associada a elevação do CK/aldolase, alterações eletromiográficas ou biópsia compatível com miosite
4	Cilindros urinários	Hemáticos, granulados ou eritrocitários
4	Hematúria	> 5 eritrócitos / campo. Excluir outras causas (litíase, infecção).
4	Proteinúria	> 0,5 g/ 24horas
4	Piúria	> 5 leucócitos / campo na ausência de infecção
2	Eritema malar	Erupções cutâneas inflamatórias
2	Alopecia	Queda de cabelo excessiva, difusa ou localizada
2	Mucosas	Úlceras orais ou nasais
2	Pleurisia	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural
2	Pericardite	Dor pericárdica com mais um dos seguintes: atrito, derrame, confirmação por ECG ou ecocardiograma
2	Hipocomplementemia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência
2	Anti-ADNs	Acima dos valores de referência do laboratório
1	Febre	Temperatura > 38°C na ausência de infecção
1	Trombocitopenia	Plaquetas < 100.000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas)

1	Leucopenia	Leucócitos < 3.000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas)
---	------------	--

Gladman, 2002(63)

1.9 Tolerância e autoimunidade

A tolerância imunológica é definida como a não-responsividade a um antígeno, quando da exposição prévia a este. Quando linfócitos específicos se deparam com antígenos, ocorre ativação ou eventualmente anergia, a última caracterizando tolerância.

Diferentes configurações do mesmo antígeno podem induzir ativação linfocítica ou tolerância (64). Antígenos que têm a capacidade de induzir tolerância são chamados de tolerógenos, ou antígenos tolerogênicos, para distingui-los dos imunógenos, que geram imunidade (65). Um único antígeno pode ser um imunógeno ou um tolerógeno, dependendo das condições em que é exposto a linfócitos específicos (por exemplo, na presença ou ausência, respectivamente, de inflamação e respostas imunes inatas). A tolerância a autoantígenos, também chamada de autotolerância, é uma propriedade fundamental do sistema imune normal, e uma falha na autotolerância resulta em reações imunes contra antígenos próprios (autólogos). Esse tipo de reação é chamado de autoimunidade, e as doenças que ela pode causar são conhecidas como doenças autoimunes (66-67).

A tolerância central é induzida nos órgãos linfoides primários (timo e medula óssea), quando linfócitos imaturos se deparam com antígenos próprios presentes nestes órgãos (68).

Em relação aos linfócitos T, a tolerância central (seleção negativa) ocorre quando tímócitos imaturos com receptores de alta afinidade reconhecem esses antígenos no timo. Algumas células T imaturas que encontram antígenos próprios no timo morrem e outras se desenvolvem como linfócitos T reguladores FoxP3⁺, que funcionam para controlar respostas a antígenos próprios em tecidos periféricos (68).

Em linfócitos B, a tolerância central é induzida quando células B imaturas reconhecem antígenos próprios multivalentes na medula óssea. O resultado comum é a aquisição de uma nova especificidade, chamada de edição de receptor, ou morte apoptótica das células B imaturas (69).

A tolerância periférica, por sua vez, ocorre quando linfócitos autorreativos maduros de tecidos periféricos são eliminados ou inativados ao interagir com antígenos próprios sob condições específicas; tornam-se incapazes de responder subsequentemente a esses antígenos devido à supressão por células T. Os mecanismos de tolerância periférica podem ser responsáveis pela tolerância das células T aos antígenos próprios dos tecidos específicos, especialmente aqueles que não são abundantes no timo. Os mesmos mecanismos podem induzir a não responsividade a formas tolerogênicas aos antígenos estranhos. Os mecanismos de tolerância periférica são anergia (não responsividade funcional) (70), supressão (71) e

deleção (morte da célula) (72). Não se sabe, ainda, se a tolerância a diferentes antígenos próprios é mantida por um ou outro mecanismo, ou se todos estes mecanismos funcionam em cooperação para prevenir uma autoimunidade perigosa (73).

Células B maduras, que reconhecem antígenos próprios na periferia na ausência de células T auxiliares, podem se tornar anérgicas e finalmente morrer por apoptose ou ficar funcionalmente irresponsivas devido à ativação de receptores inibitórios (74).

A figura 2 mostra como a autotolerância pode ser induzida em linfócitos autorreativos imaturos nos órgãos linfóides primários (tolerância central) ou em linfócitos maduros em locais periféricos (tolerância periférica).

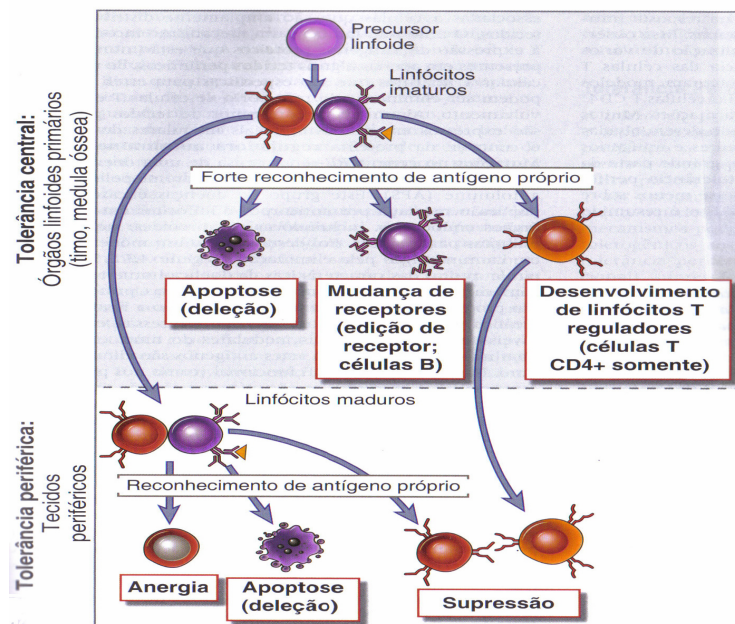


Figura 2: Tolerância central e periférica a antígenos próprios. Abbas(75)

1.10 Células T reg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺

O termo “células T reguladoras” (Treg) se refere a uma população da família de linfócitos T com propriedades supressoras/regulatórias associadas à manutenção da tolerância antígeno-específica. Pelo menos três subconjuntos de células Treg CD4⁺ com mecanismos supressivos distintos são diferenciados por seus fenótipos, secreção de citocinas e tecidos de origem (76). Estes são células Treg do tipo I (Tr1), células T auxiliares-3 (Th3) e células Treg CD4⁺CD25⁺. Cada uma destas células tem a capacidade característica de inibir ativamente a proliferação e a função efetora de outras células T (77-78).

As células Treg CD4⁺ CD25⁺ (Treg) constituem, em média, 1-2% das células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP), e são caracterizadas pela sua capacidade de suprimir a proliferação das células T *in vitro* (79-80).

Apesar das exclusivas características supressoras das células Treg comparadas com outros linfócitos, suas características celulares são pouco conhecidas. As células Treg são geralmente identificadas com base na expressão de seus marcadores de superfície, incluindo o receptor de IL-2 (CD25) (81), receptor fator de necrose tumoral (TNF) induzido por glicocorticóides (GITR) (82), linfócito T citotóxico associado a proteína 4 (CTLA-4) (83), junto com alta expressão de CD95 e, em humanos, baixa expressão de CD45RB e CD127 (84-85). Entretanto, cada um desses marcadores pode estar dinamicamente expresso em outras subpopulações celulares (74); assim, ainda

há notórias dificuldades em identificar um definitivo marcador de superfície para distinguir as células Treg de outras células T.

A busca por um marcador específico para células Treg foi determinada pela identificação de uma mutação no gene que resulta na grave doença intitulada “desregulação imune: poliendocrinopatia e enteropatia”, uma síndrome ligada ao cromossomo X (IPEX) e doenças análogas em ratos mutantes conhecidos como ratos “scurfy”. A mutação responsável foi localizada no gene que codifica o fator de transcrição, da família *forkhead*, conhecido como FoxP3. Mutação nesse gene leva a um defeito funcional na proteína resultante e conseqüentemente aparecimento precoce de graves afecções linfoproliferativas/autoimunes (86). A ligação entre a expressão de FoxP3 e o desenvolvimento e função das células Treg foi demonstrada, pela primeira vez, por Fontenot *et al*, que documentaram hiper-expressão de FoxP3 mRNA na população de linfócitos CD4⁺CD25⁺ supressores (87).

Apesar de numerosas populações de células T terem sido descritas como supressoras, o tipo de célula cuja função reguladora foi melhor estabelecida foi a CD4⁺CD25^{alto}FoxP3⁺. Ambos, FoxP3 e CD25, são essenciais para a geração, manutenção e funcionamento destas células (87). Células reguladoras geralmente expressam baixos níveis de receptores IL-7 (CD127) e utilizam IL-2, mas não IL-7 como seu fator de crescimento e sobrevivência. Células T de memória, diferentemente, são CD127^{alto} e CD25^{baixo} e dependem da IL-7 para sua manutenção. As células T reguladoras FoxP3⁺ expressam, também, altos níveis de CTLA-4 necessários para seu funcionamento (16, 75).

A tabela 7 descreve os marcadores para as células Treg.

Tabela 7: Marcadores para células Treg

Marcador	Localização	Nível de expressão	Especificidade para células T _{reg}	Expressão por outras linhagens
CD25	Superfície	Alto	++	Efetora /célula T memória
CD95	Superfície	Alto	++	Efetora/célula T memória
GITR	Superfície	Alto	++	Efetora/célula T memória
CTLA-4	Superfície	Alto	++	Efetora/célula T memória
CD45RB	Superfície	Baixo	++	Efetora /célula T memória
FoxP3	Intranuclear	Alto	+++++	Células gigantes trofoblásticas
Nrp	Superfície	Alto	+++	Neurônios
LAG-3	Superfície	Alto	+++	Células B
CD127*	Superfície	Baixo	++++	Células T recentemente ativadas

* somente em humanos. M. Miyara et al. (88)

Células Treg desempenham um importante papel na homeostase celular e são reguladores críticos da tolerância imune. Deficiências quantitativas e/ou qualitativas nas células Treg têm sido apontadas no desenvolvimento de doenças autoimunes (77, 81, 89-91).

1.11 Dinâmica de diferenciação de células T CD4⁺ em células T CD4⁺ FoxP3⁺

Após ativação via RCT (receptor de células T), as células CD45RA⁺FoxP3^{baixo} (com baixa expressão de FoxP3) tímicas, *naïve* ou em repouso, proliferam e se diferenciam em células T regulatórias (Treg) efetoras ou ativadas que apresentam alta expressão de FoxP3 (FoxP3^{alto}) e ausência do receptor CD45RA (CD45RA⁻) (88). As

células Treg FoxP3^{alto}CD45RA⁻ advêm principalmente de células Treg originadas do timo, mas também podem se diferenciar a partir de outras subpopulações de células T CD4⁺, como células T CD4⁺ *naïve*, células T CD4⁺CD45RA⁻ ativadas e células não-Treg FoxP3⁻CD45RA⁻.

Células Treg efetoras são responsáveis por suprimir/controlar a proliferação celular, assim como a função efetora das células T. Além disso, controlam a proliferação e a ativação de outras células Treg em repouso por meio de retroalimentação (88). A figura 3 mostra a dinâmica de diferenciação das células T CD4⁺ a partir do timo.

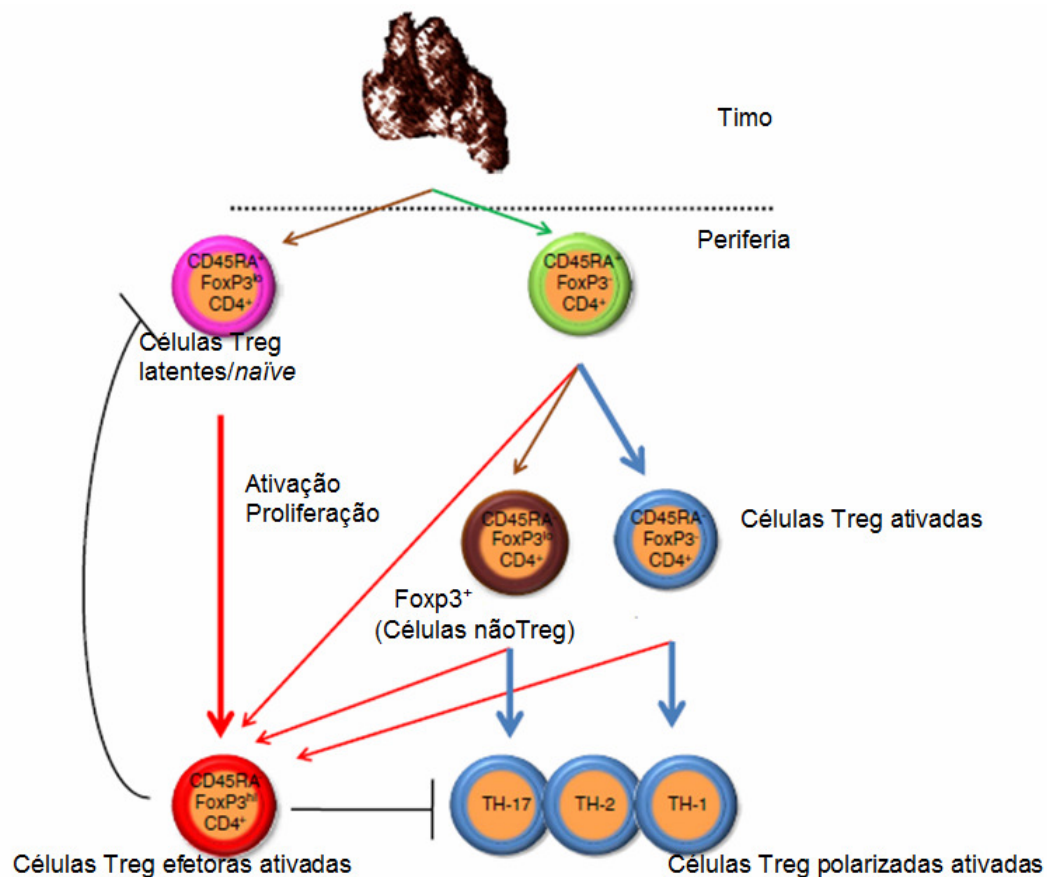


Figura 3: Dinâmica de diferenciação de células T CD4⁺ em células T CD4⁺ FoxP3⁺. Miyara (88)

1.12 Mecanismos de ação de células T reguladoras

As células Treg parecem suprimir respostas imunológicas em múltiplas etapas, incluindo inibição da função da célula T em órgãos linfóides e na etapa efetora destas respostas em tecidos. Apesar de outros mecanismos de supressão terem sido descritos, os mais citados envolvem a ação de citocinas inibitórias e um efeito mediado por contato nas células apresentadoras de antígenos (CAA) (92).

As células Treg produzem IL-10 e TGF- β , que inibem respostas imunológicas. Estas citocinas estão envolvidas tanto na geração quanto no funcionamento de células Treg. Além de serem produzidas por muitos outros subtipos celulares, também atuam em outras que não as células reguladoras (92).

Outro mecanismo proposto para a ação das células Treg é CTLA-4-dependente. O CTLA-4 é uma molécula sinalizadora de controle negativo das células T; é expressa pelas células reguladoras FoxP3⁺ e parece ser necessária para seu funcionamento. É concebível que o CTLA-4 de moléculas reguladoras se ligue a moléculas B7 nas CAA. Uma menor disponibilidade de B7 resulta em diminuição da co-estimulação para respostas celulares (93-96).

Outros mecanismos supressores atribuíveis às células T reguladoras incluem o consumo de IL-2, o que diminui a resposta de proliferação de células T (96). Ainda não está estabelecido se todas as células reguladoras funcionam através de todos estes mecanismos ou se há sub-populações que usam mecanismos diferentes para controlar

respostas imunológicas (96). Existem, no entanto, evidências de que duas populações diferentes de células Treg em humanos podem ser distinguidas pela expressão de FoxP3 ou pela produção de IL-10 (96).

A figura 4 ilustra os mecanismos de ação das células Treg.

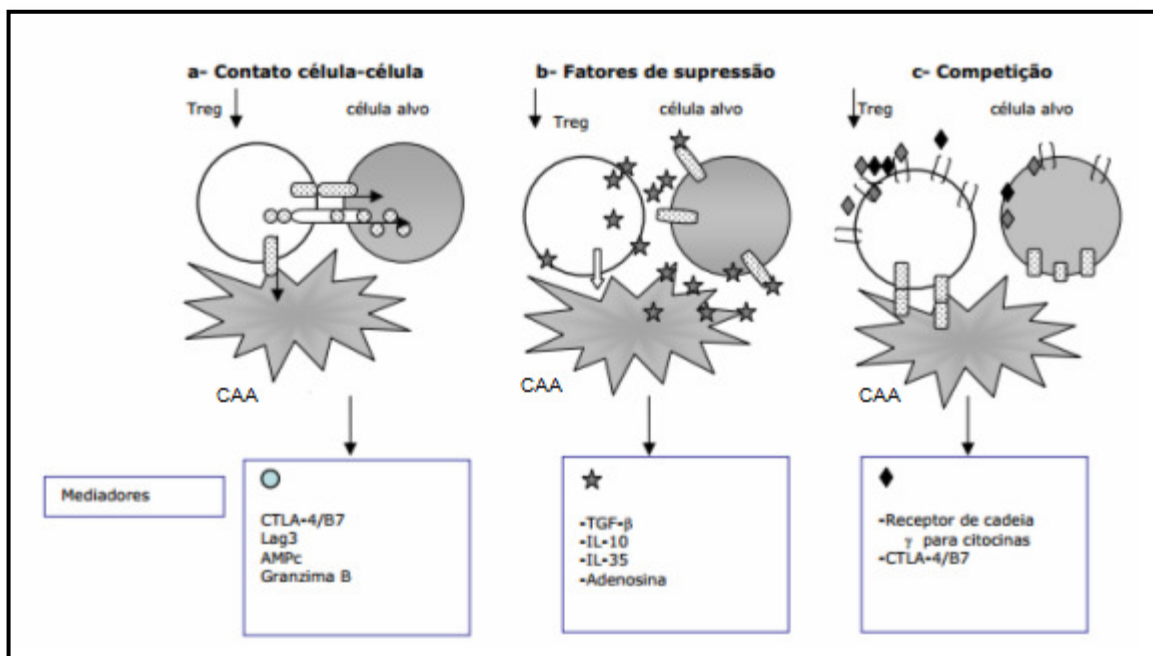


Figura 4: Modelos de mecanismos de ação das Treg: (a) Contato célula-célula – supressão da célula-alvo com liberação de fatores de supressão, incluindo o monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), citocinas supressivas como o TGF- β , citólise direta ou sinalização negativa através da molécula CTLA-4; (b) Fatores de supressão solúveis como citocinas IL-10, TGF- β e IL-35 ou secreção de fatores supressivos pelas CAA como adenosina; c) Competição – Competição por citocinas que sinalizam através de receptores da cadeia γ comum (IL-2, IL-4 e IL-7 (Adaptado de Sojka *et al.*)(97)

1.13 Células T reguladoras e doenças autoimunes

A elucidação da base genética da doença IPEX e da doença similar em camundongos, causada por mutações no gene FoxP3 (86), é prova convincente da

importância das células Treg na manutenção da autotolerância e da homeostase do sistema imunológico. Inúmeras tentativas estão sendo efetuadas para identificar defeitos no desenvolvimento ou funcionamento das células Treg nas doenças autoimunes (98-99). Parece provável que defeitos na geração ou no funcionamento de células Treg ou a resistência de células efetoras à supressão contribuam significativamente para a patogênese de muitas doenças autoimunes (100), incluindo psoríase, *miastenia gravis* e artrite reumatoide (AR) (101). Em adição, defeitos de células Treg desempenham um papel cada vez mais reconhecido em uma grande variedade de doenças tumorais e infecciosas (102-103). O uso de células Treg como terapia imunomoduladora poderá se constituir, no futuro, fato consumado para doenças autoimunes, neoplásicas e infecções (104). Nos próximos tópicos, destacamos a relação entre células Treg e algumas doenças autoimunes.

Artrite reumatoide

Existem inúmeros trabalhos com populações de células Treg na AR com variadas conclusões a respeito da frequência das células Treg circulantes. Alguns estudos relatam proporções diminuídas (105-107) ou normais (108-109) de células Treg definidas como CD4⁺CD25⁺/alto ou FoxP3⁺, enquanto outros autores (51, 110-111) descrevem aumento dos níveis circulantes destas células.

Em outro estudo, diminuição das células Treg foram reportadas somente em estágios precoces da doença (112). Entretanto, sabe-se que um número aumentado de

células Treg está presente em articulações inflamadas (105-106, 113-117) ou outros sítios inflamatórios. A definição fenotípica das células Treg é fundamental para interpretar estas observações, uma vez que as expressões de FoxP3 e CD25 podem ser moduladas por inflamação e ativação de células T. Entretanto, as células Treg em pacientes com AR, ao menos as periféricas, não parecem secretar uma maior quantidade de IL-2 ou IFN- γ em comparação a indivíduos saudáveis, sugerindo que a expressão de FoxP3 é mais indicativa de função Treg (118).

Uma contradição desafiadora na AR advém do fato de que, enquanto as células Treg podem ser disfuncionais, células Treg do líquido sinovial parecem ser totalmente supressoras *in vitro* (106, 113, 115). Entretanto, *in vivo*, a atividade das células Treg parece estar prejudicada pelo ambiente altamente inflamatório do líquido sinovial (116).

Lúpus eritematoso sistêmico

O fenótipo e a função das células Treg no LES têm sido foco de intensa pesquisa. Muitos estudos recentes apontam para uma diminuição na proporção de qualquer célula T CD4+CD25^{alto} ou de células Treg CD4+CD25+FoxP3+ na doença lúpica ativa (119-121). Vários grupos têm demonstrado que tal diminuição foi negativamente correlacionada à atividade da doença ou às concentrações de anticorpos anti-dsDNA circulantes (120, 122-124). Entretanto, esses achados são ainda controversos, pois

níveis normais ou aumentados de células Treg CD25 e/ou FoxP3 expressando CD4⁺ foram observados por outros grupos de autores (108, 125-126).

Essas discrepâncias podem ser explicadas pela ocorrência, em populações lúpicas, de subpopulações de células T efectoras CD4⁺ que expressam FoxP3; eventualmente, estas células, virtualmente ausentes em doadores saudáveis, expressam CD25 em níveis baixos na doença ativa (122, 124, 127). Além disso, aparentemente células T CD4⁺ efectoras acentuam a presença de FoxP3 em sítios altamente inflamatórios (106, 124, 127-130).

Entretanto, outras análises quantitativas da expressão de FoxP3 por PCR ou imunohistoquímica indicam que as células Treg estão pouco presentes nos principais órgãos alvo, como linfonodos, pele e rins de pacientes com LES (120, 131-132).

Síndrome de Sjögren primária

A síndrome de Sjogren primária (SSp) é uma exocrinopatia autoimune com várias nuances sistêmicas. Deficiência em número ou função das células Treg foi reportada em pacientes com síndrome de SSp. De forma similar à descrita para pacientes com LES, o papel das células Treg na SSp é controverso: de acordo com diferentes estudos, níveis diminuídos (133), normais (120, 134) ou aumentadas (130)

foram documentados. Em alguns destes estudos (135-136) a função supressora das células Treg *in vitro* se mostrou adequada.

A localização de células Treg em glândulas salivares é também conflitante. Tanto ausência de células Treg (136) como presença das mesmas (134) foram relatados na sialoadenite linfocítica típica da SSp.

Outras doenças autoimunes

De forma análoga à AR e ao LES, as vasculites são caracterizadas por um ambiente altamente inflamatório, onde a função supressiva das células Treg pode estar prejudicada. Vários grupos estudaram o comportamento de células Treg em vasculites associadas ao ANCA (anticorpos anticítosplasma de neutrófilos). Na granulomatose de Wegener, foram relatados tanto a diminuição de células CD4⁺ CD25⁺ (137-139), como o aumento de células Treg CD4⁺ em fases de exacerbação da doença (140).

Em vasculites associadas ao anticorpo anti-PR3 e na crioglobulinemia, a função supressora das células T CD4⁺ CD25⁺ se mostrou deficiente (141), o que não ocorreu em pacientes com vasculite anti-MPO (mieloperoxidase)-positivos, onde a função Treg se encontrava normal (142). Entretanto, relatos recentes apontam para uma expressão diminuída de células Treg nas vasculites associadas à anti-MPO e anti-PR3 (143).

Estudos acerca da função Treg em miopatias são escassos. Células Treg parecem proteger camundongos propensos a miopatias autoimunes (144), estudos em subpopulações de Treg em miosites são escassos. Células T CD4⁺ CD25⁺ estão presentes em quantidades normais no sangue periférico de pacientes com miopatia inflamatória (120). De interesse, o número de células FoxP3⁺ pareceu estar relacionado com o grau de infiltração muscular por linfócitos CD3 (145).

Estudos recentes indicam que uma alta frequência de células Treg em doadores de medula óssea está associada a um menor risco doença enxerto x hospedeiro (EVH) no receptor. Baixas contagens de células Treg CD4⁺ FoxP3⁺ no receptor, por sua vez, estiveram relacionadas com aumento do risco de doença EVH (146). Estes achados demonstram que células Treg são instrumentos no controle da doença EVH (147).

Na esclerose sistêmica (ES), foi recentemente descrito um aumento de Tregs circulantes; no entanto, a capacidade supressora das células se mostrou comprometida (148). Estes achados podem estar atrelados a uma inativação distorcida do cromossomo X (149). Um aumento do número de células Treg circulantes em pacientes esclerodérmicos foi também observado em outro estudo, porém a contagem celular se fundamentou na mera expressão de CD25 (147). Diferentemente, uma diminuição das células expressando FoxP3 foi documentada no sangue periférico e na pele de pacientes com ES (150).

É possível que defeitos de número e/ou função de células Treg estejam envolvidos na patogênese da ES (151), mas os dados acumulados até o momento (148-152) são motivos de polêmica, necessitando elucidação em estudos futuros.

1.14 Células B

Os linfócitos B representam 5% a 15% da população de linfócitos circulantes e são classicamente definidos pela presença de imunoglobulinas de membrana. Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos (75). Uma vez ativados, os linfócitos B se diferenciam em células que secretam diferentes classes de anticorpos, com funções distintas. A resposta das células B a antígenos proteicos exige sinais ativadores das células T CD4⁺. As células B podem responder a numerosos antígenos não proteicos sem a participação de outras células.

O desenvolvimento de células B em humanos e roedores ocorre em dois estágios: no primeiro, anatomicamente visto em órgão linfóide primário (medula óssea), recombinações gênicas VDJ nas cadeias da imunoglobulina geram expressão de receptores antígeno-específicos em células B (RCB) imaturas; com a migração de linfócitos B para tecidos linfóides periféricos, estas imunoglobulinas de superfície podem reconhecer antígenos conformacionais na periferia (153-155).

O segundo estágio ocorre em grande parte em linfócitos B de centros germinativos (CG). Neste contexto, imunoglobulinas que passam por hipermutações somáticas são positivamente selecionadas para aumentar a afinidade para antígenos microbianos, e negativamente selecionadas para respostas contra antígenos próprios (156). Entretanto, a natureza deste processo é aleatório, e linfócitos B autorreativos podem passar a produzir autoanticorpos patogênicos. Conseqüentemente, células B necessitam de controles reguladores em seus vários estágios de diferenciação (153, 155).

Tem-se tornado claro, nos últimos anos, que as células B, como as células T, são providas de ampla variação de recursos funcionais. Não somente elas produzem anticorpos, mas podem, também, transferir antígenos para tecidos linfoides periféricos (157), atuar como CAA e secretam citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias. Assim, dependendo das circunstâncias, elas se comportam como células efetoras ou reguladoras (158-160).

De importância, tanto em modelos murinos (161) quanto em humanos (162) admite-se a existência de uma subpopulação de células B secretoras de IL-10, com propriedades reguladoras (Bregs); estas poderiam controlar respostas imunes de linfócitos B e também da rede de linfócitos T. Os efeitos indiretos da supressão de células T por células Bregs incluem deleção, indução de anergia e, interessante, expansão seletiva de células Treg (161). Esta variedade de funções dos linfócitos B provavelmente será explorada do ponto de vista terapêutico em anos futuros (163).

1.15 Papel das células B em doenças autoimunes

O aparecimento de fenômenos de autoimunidade está relacionado a falhas de mecanismos que controlam a tolerância para autoantígenos; como decorrência, células B autorreativas podem gerar síntese de autoanticorpos e imunocomplexos. Perturbações dos genes que afetam a ativação inicial das células B (CD19, CD22, SHP2) ou que regulam a apoptose (bcl-2, bcl-x, Fas/FasL) aumentam a probabilidade de células B autorreativas clonalmente se expandirem, determinando processos autoimunes (164-165).

O papel preciso das células B na patogênese das doenças autoimunes tem sido estudado por dois diferentes caminhos. O primeiro envolve modelos experimentais; como exemplo, camundongos NOD, espontaneamente predispostos ao diabetes tipo 1, falham em desenvolver a doença se depletados de células B. A depleção de células B, neste caso, reduz a ativação de células T autorreativas (166). Também de interesse, em camundongos deficientes para AIRE (gene regulador autoimune), a infiltração multiorgânica por células B pode ser revertida com drogas anti-CD20, depletora de células B (167). Neste modelo, assim como nos camundongos NOD, as células B exercem seu efeito patogênico, apresentando autoantígenos para receptores de células T e sintetizando citocinas expansoras da imunidade celular (156).

O segundo modelo acerca do papel de linfócitos B em doenças autoimunes diz respeito a estudos em neonatos humanos. Autoanticorpos patogênicos de classe IgG, capazes de atravessar o tecido placentário, podem desencadear fenômenos autoimunes neonatais, muitas vezes transitórios. Exemplos incluem a doença de Graves, a *miastenia gravis*, a púrpura trombocitoênica idiopática e o lúpus eritematoso sistêmico anti-Ro/SSA positivo (168). Em algumas outras instâncias, autoanticorpos, mesmo não diretamente patogênicos, podem funcionar como marcadores de autoimunidade neonatal, como no caso dos anticorpos contra ilhotas no diabetes tipo 1 e contra mitocôndrias ou músculo liso na hepatite autoimune (156, 169).

Por outro lado, o papel das células B como CAA é notório em afecções como a esclerose múltipla, neuropatia desmielinizante e AR. Como visto, em diferentes circunstâncias o papel patogênico dos linfócitos B difere, tornando bastante complexa a compreensão do papel biológico destas células no dano multiorgânico visto em doenças autoimunes (156).

2 JUSTIFICATIVA

Está claramente estabelecido que as células Treg são instrumentos de controle nos processos autoimunes. Numerosos estudos relatam alterações quantitativas e/ou funcionais de células Treg em pacientes com doenças autoimunes, sugerindo

fortemente que a perda da capacidade supressora inerente à função Treg esteja ligada ao deflagramento destes distúrbios.

Embora o papel das células Treg já tenha sido investigado em uma série de doenças autoimunes do tecido conjuntivo (88, 151, 170-171), pouco se conhece sobre o papel regulatório destas células em pacientes com SAF.

Sabidamente, pacientes com SAF e LES apresentam uma interface clínica por vezes nebulosa. Indivíduos com SAF não raramente apresentam achados de LES; alternativamente, alguns pacientes com LES apresentam AAF circulantes e, por vezes, SAF secundária definida (172). A quantificação de células Treg é ainda desconhecida em pacientes com SAF primária ou secundária, o que justifica o interesse atual no tema. Potenciais disfunções quantitativas de células Treg poderiam contribuir para uma melhor compreensão da patogenia da SAF nestes 2 grupos de pacientes.

O comportamento dos linfócitos B em doenças autoimunes é ainda motivo de polêmica. Atualmente, as células B constituem alvo definido para anticorpos monoclonais no tratamento de algumas afecções autoimunes (173). O recente achado que aponta um papel para células B na diferenciação de populações Treg (174) despertou nosso interesse paralelo na quantificação destas células neste estudo.

3 HIPÓTESES

Hipótese operacional:

O número de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ e de linfócitos B $CD3^+CD19^+$ circulantes não se encontra alterado em pacientes com SAF primária e/ou secundária comparativamente a controles sadios.

Hipótese conceitual:

O número de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ e de linfócitos B $CD3^+CD19^+$ circulantes se encontra alterado em pacientes com SAF primária e/ou secundária comparativamente a controles sadios.

4 OBJETIVO

Quantificar as células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ e linfócitos B $CD3^+CD19^+$ em pacientes com SAF primária e/ou secundária comparativamente a controles sadios.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento:

Estudo transversal, controlado.

Tamanho da amostra:

Para detectar uma diferença entre os valores médios das células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e células B CD3⁻CD19⁺ com magnitude maior ou igual a 1 desvio padrão, estimou-se que seriam necessários 25 pacientes por grupo (25 pacientes com SAF primária, 25 com SAF secundária ao LES e 25 controles saudáveis) para um $\alpha = 0,05$ e poder estatístico de 90%.

Sujeitos:

Casos:

Pacientes com SAF primária classificados de acordo com os critérios do Consenso Internacional de Classificação da SAF de 2006(2). Pacientes com LES e SAF selecionados através dos critérios de classificação proposta pelo American College of Rheumatology para LES(58) e pelo Consenso Internacional de Classificação da SAF(2).

Indivíduos com LES e SAF secundária foram, ainda, categorizados quanto à atividade da doença lúpica através do SLEDAI (*Índice de atividade da doença no lupus eritematosos sistêmico*)(59).

Em ambos os grupos de casos, foram observados os seguintes critérios de exclusão: idade menor que 16 anos, endocardite infecciosa, neoplasia (corrente ou passada), diabetes mellitus tipo 1, e infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) ou *Treponema pallidum*.

Em todos os pacientes foram avaliados os seguintes critérios: idade, sexo, tempo de doença, manifestações clínicas e laboratoriais, medicações utilizadas e comorbidades.

Os pacientes foram recrutados consecutivamente do ambulatório de Reumatologia/LES do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul/PUCRS entre os meses de outubro de 2011 e outubro de 2012.

Controles:

Voluntários saudáveis pareados por sexo e idade que aceitaram participar do estudo, e adequados aos critérios de inclusão: idade maior que 16 anos, ausência de doença reumática ou outras doenças autoimunes, diabetes, neoplasia (corrente ou

passada), hipertensão, e infecções bacterianas ou virais recentes. Foram excluídos indivíduos sob uso de fármacos que induzissem alterações imunológicas, como anti-inflamatórios ou imunossupressores, tanto no dia da coleta do sangue como nos últimos três meses.

O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de cada paciente e voluntário saudável. O estudo foi aprovado pelos Comitês Científico e de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS (Of CEP – 486/11).

Coleta de sangue e isolamento de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

As amostras (20 ml) de sangue foram coletadas usando EDTA (ácido etileno diaminotetracético) como anticoagulante. Uma alíquota (5 ml) foi reservada para a realização de hemograma. Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas do sangue total por gradiente de densidade, usando-se Ficoll-PaqueTM PLUS (SteamCell) através de centrifugação durante 35 min a 400g. A interface, contendo as CMSP, foi coletada e lavada com PBS. Após uma nova centrifugação, durante 10 minutos a 200g, as CMSP foram ressuspensas com meio RPMI 1640 (RPMI, suplementado com 0,5% de gentamicina, 1% Hepes mais 10% de soro fetal bovino, todos da Sigma (St. Louis, MO) e contadas por microscopia (100X); a contagem foi

ajustada de modo a destinar 2.10^5 células por tubo para marcação de células B e 1.10^6 células para cada amostra de células Treg.

Anticorpos

Foram utilizados os anticorpos CD4 FITC , CD25 APC, FoxP3 PE (BD Biosciences – San Jose, CA, EUA), para marcação das células T reguladoras e CD3 CY5 e CD19 PE (BD Biosciences – San Jose, CA, EUA) para a marcação de células B. Em todos os experimentos, anticorpos controles (compensação) dos respectivos isotipos IgG foram incluídos.

Imunofenotipagem

As subpopulações de linfócitos foram identificadas por citometria de fluxo multicolor. CMSP foram lavadas com tampão de citometria (PBS contendo FCS e 0,01 % de azida sódica) e tratadas com solução de Fc block durante 20 minutos no escuro, para bloquear receptores Fc e evitar ligações de anticorpos inespecíficos. As células foram marcadas com combinações dos seguintes anticorpos monoclonais (2 μ L): CD3 CY5, CD19 PE, para células B e CD4 FITC, CD25 APC, para células T. Na marcação intracelular para FoxP3, foi utilizado 20 μ L de anticorpo monoclonal FoxP3 PE segundo instruções do fabricante (BD Biosciences). Imediatamente à marcação, as células foram lavadas, ressuspendidas e analisadas por citometria de fluxo. Um mínimo de 20.000

eventos foram identificados por tamanho (FSC) e granulometria (SSC) e adquiridos por um citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences); os valores foram determinados pelo *software* FACSDiva v5.0.2 e analisados pelo *software* FlowJo (TreeStar US, Ashland, OR). A fluorescência de fundo foi avaliada usando como controle anticorpos monoclonais isotipo e fluorocromo correspondentes.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi efetuada usando-se média \pm desvio-padrão, teste t de Student e teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas, e chi-quadrado ou exato de Fischer para variáveis categóricas. As relações entre as variáveis foram avaliadas através de covariância (ANCOVA). A correlação entre células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e SLEDAI foi avaliada através do teste de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o *software* Statistical Package for Social Sciences, SPSS 17.0 Statistics (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), enquanto os gráficos foram gerados pelo *software* Prisma 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados de significância estatística.

7 RESULTADOS

Foram estudados 50 pacientes com SAF (25 com forma primária, 25 com SAF secundária a LES) e 25 controles. Em relação à população global de pacientes com SAF primária e secundária, a média de idade foi de 44,8 anos \pm 13,7 (variando de 17 a 76 anos); houve predomínio do sexo feminino (92 %) e da cor branca (93,9 %). Nenhum destes achados diferiu significativamente em relação aos controles ($P > 0,05$). A duração média da doença em pacientes com SAF foi 9,38 \pm 7,39 anos.

Quando as populações de SAF primária e secundária foram comparadas entre si, não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais. Trombose venosa profunda foi a característica clínica mais frequente de pacientes com SAF primária e secundária. Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais de pacientes com SAF primária e secundária podem ser vistos na tabela 8.

Tabela 8: Características demográficas, clínicas e laboratoriais entre pacientes com síndrome antifosfolipídica (SAF) primária e secundária

	SAF primária n = 25	SAF secundária n = 25	P
Sexo feminino n(%)	22 (88)	24 (96)	0,615*
Cor branca n(%)	22 (88)	24 (96)	0,615*
Idade n(%)	46,00 ± 14,75	43,5 ± 12,84	0,732**
Duração da doença (anos±DP)	8,90 ± 7,11	9,87 ± 7,81	0,418**
SLEDAI	-	10,00 ± 5,77	-
aCL n(%)	24 (96)	21 (84)	0,928*
AL n(%)	5 (20)	9 (36)	0,123*
Trombose venosa profunda de membros inferiores/superiores n(%)	18 (72)	15 (60)	0,781*
Tromboembolismo pulmonar n(%)	3 (12)	2 (8)	0,753*
AVC isquêmico n(%)	6 (24)	3 (12)	0,379*
Abortos espontâneos n(%)	4 (16)	3 (12)	0,825*
Óbitos fetais n(%)	9 (36)	6 (24)	0,331*
Neurite óptica n(%)	2 (8)	4 (16)	0,307*
Infarto intestinal n(%)	1 (4)	0	0,681*
Trombose de via porta n(%)	2 (8)	0	0,490*
Esclerose renal	1 (4)	1 (4)	1,000*

n: número amostral DP: desvio padrão *Teste Qui-quadrado ou exato de Fischer e **Teste t de student
SLEDAI: Índice de atividade de doença Lúpus Eritematoso Sistêmico (Doença ativa SLEDAI > 4)
aCL: anticorpo anticardiolipina AL : anticoagulante lúpico AVC: acidente vascular cerebral

As células marcadas obtidas pela citometria de fluxo foram quantificadas em percentuais através da análise pelo software *FlowJo*. Os pacientes foram divididos em dois grupos: um com SAF primária e outro com SAF secundária ao LES. Estes grupos foram comparados com o grupo controle.

Analisando-se comparativamente pacientes com SAF primária e controles, observamos que o número de linfócitos totais, células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e células B CD3⁻CD19⁺ foi significativamente menor em pacientes com SAF primária.

Estes dados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos na síndrome antifosfolípídica primária (SAF) e controles

Células	SAF* (n = 25)		Controles* (n = 25)		P**
	Valor percentual (%)	Valor absoluto (células/ μ L)	Valor percentual (%)	Valor absoluto (células/ μ L)	
Linfócitos Totais	29,42 \pm 4,57	2311,65 \pm 395,62	32,22 \pm 2,49	2523,60 \pm 528,83	0,020
Linfócitos T CD3 ⁺ CD19 ⁻	73,72 \pm 8,34	1704,15 \pm 192,79	73,64 \pm 8,34	858,38 \pm 194,32	0,984
Linfócitos CD4 ⁺ CD25 ⁺	1,28 \pm 0,89	29,59 \pm 20,57	1,81 \pm 0,80	45,68 \pm 20,19	0,061
Linfócitos CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0,74 \pm 0,34	17,11 \pm 7,86	1,83 \pm 0,77	46,18 \pm 19,43	<0,0001
Linfócitos B CD3 ⁻ CD19 ⁺	5,71 \pm 2,66	131,99 \pm 61,49	9,25 \pm 3,00	233,43 \pm 75,71	<0,0001

*Média \pm DP; **Teste de t de student

Os pacientes com SAF primária apresentaram níveis significativamente baixos de células Treg após verificação (ANCOVA) da percentagem de linfócitos (F=28,75, P<0,0001). A expressão de FoxP3 em células CD4⁺CD25⁺, estimada pela média de intensidade de fluorescência (MFI), não foi diferente em pacientes com SAF primária em relação aos controles (2816,05 \pm 1146,59 vs 2470,65 \pm 1732,87, P = 0,45).

A figura 5 mostra a estratégia usada na separação das células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ a partir de linfócitos obtida de pacientes com SAF primária e controles.

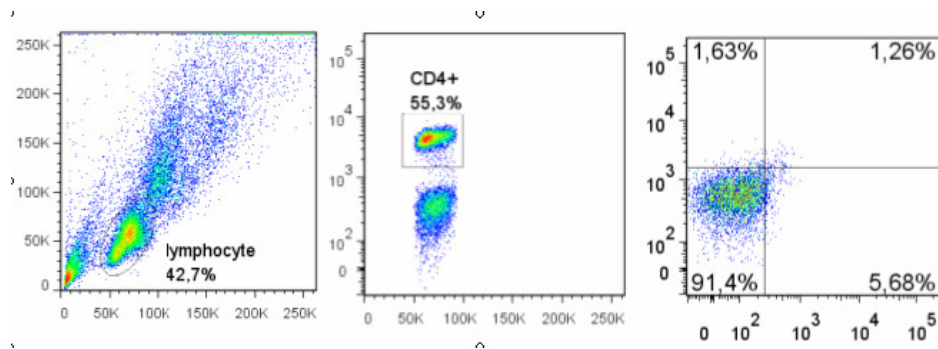


Figura 5: Estratégia de separação das células T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$

A figura 6 mostra a marcação característica das células T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, comparando-se as populações controles e pacientes com SAF primária.

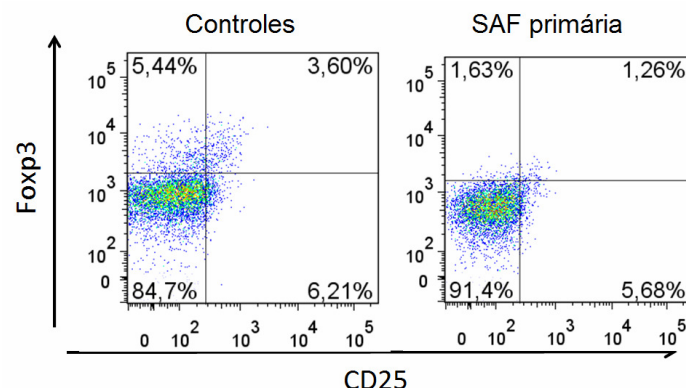


Figura 6: Marcação de células T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ em pacientes com síndrome antifosfolípida (SAF) primária e controles

A figura 7 ilustra uma representativa marcação de células $CD3^+CD19^-$ em pacientes com SAF primária e controles.

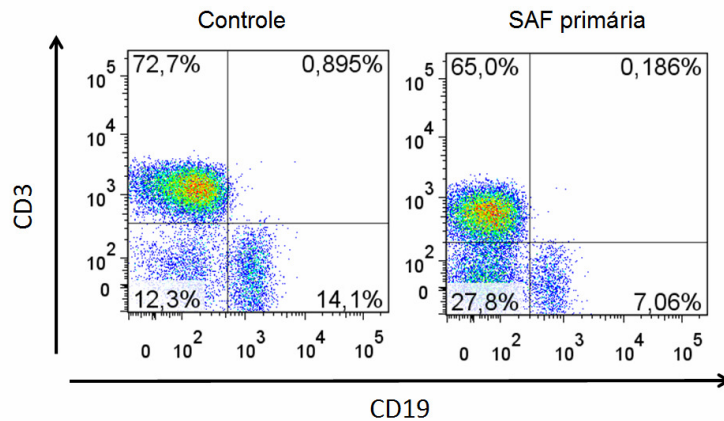


Figura 7: Representação da marcação de células B $CD3^+CD19^+$ em pacientes com síndrome antifosfolipídica (SAF) primária e controles

A figura 8 mostra a distribuição percentual dos linfócitos totais, células $TCD4^+CD25^+FoxP3^+$ e células B $CD3^+CD19^+$ em controles e em pacientes com SAF primária.

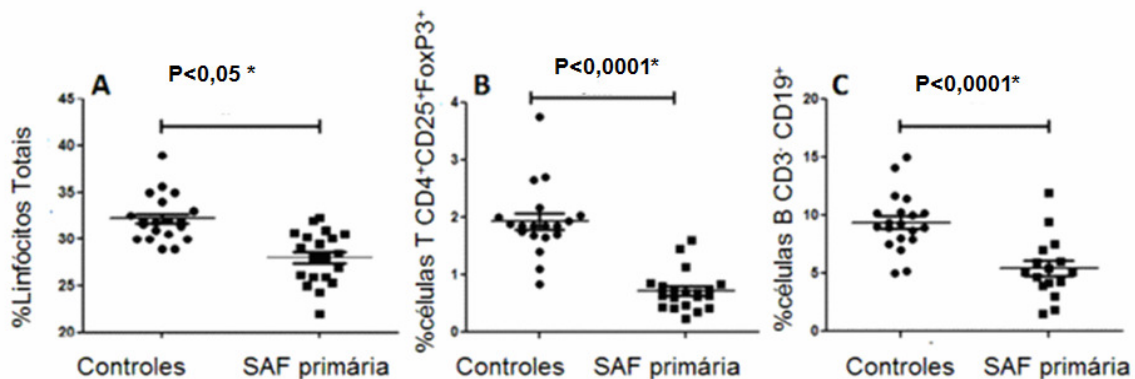


Figura 8: Distribuição gráfica percentual de linfócitos totais(A), células $TCD4^+CD25^+FoxP3^+$ (B) e células B $CD3^+CD19^+$ (C) em controles e pacientes com síndrome antifosfolipídica (SAF) primária *Diferenças avaliadas pelo teste t de student

Efetuando-se a mesma análise para pacientes com SAF secundária e controles sadios, observou-se que não houve diferença significativa na contagem de linfócitos totais entre os grupos.

De forma similar à população com SAF primária, os pacientes com SAF secundária apresentaram diminuição significativa de linfócitos CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e linfócitos CD3⁻CD19⁺ em relação aos controles. Os resultados desta análise são apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos na síndrome antifosfolípida (SAF) secundária e controles

Células	SAF* (n = 25)		Controles* (n = 25)		P**
	Valor percentual (%)	Valor absoluto (células/ μ L)	Valor percentual (%)	Valor absoluto (células/ μ L)	
Linfócitos Totais	29,74 \pm 6,79	2227,86 \pm 528,83	32,22 \pm 2,49	2523,60 \pm 528,83	0,131
Linfócitos T CD3 ⁺ CD19 ⁻	68,34 \pm 13,46	1522,52 \pm 527,20	73,64 \pm 8,34	858,38 \pm 194,32	0,100
Linfócitos CD4 ⁺ CD25 ⁺	0,92 \pm 0,42	20,50 \pm 9,35	1,81 \pm 0,80	45,68 \pm 20,19	0,081
Linfócitos CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0,97 \pm 0,57	21,61 \pm 12,70	1,83 \pm 0,77	46,18 \pm 19,43	<0,0001
Linfócitos B CD3 ⁻ CD19 ⁺	6,12 \pm 4,16	136,34 \pm 92,68	9,25 \pm 3,00	233,43 \pm 75,71	<0,006

* Média \pm DP ** Teste de t de student

Os pacientes com SAF secundária, de maneira semelhante àqueles com a doença primária, apresentaram níveis significativamente baixos de células Treg após verificação (ANCOVA) da percentagem de linfócitos (F=28,50, P<0,001). Igualmente, a expressão de FoxP3 em células CD4⁺CD25⁺, estimada pela média de intensidade de fluorescência (MIF) também não se alterou entre pacientes com SAF secundária em controles (2660,55 \pm 1044,06 vs 2470,65 \pm 1732,87, P = 0,67).

As células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ em pacientes com SAF secundária e controles ilustradas na figura 9, foram obtidas através da mesma estratégia usada na separação das células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ na SAF primária.

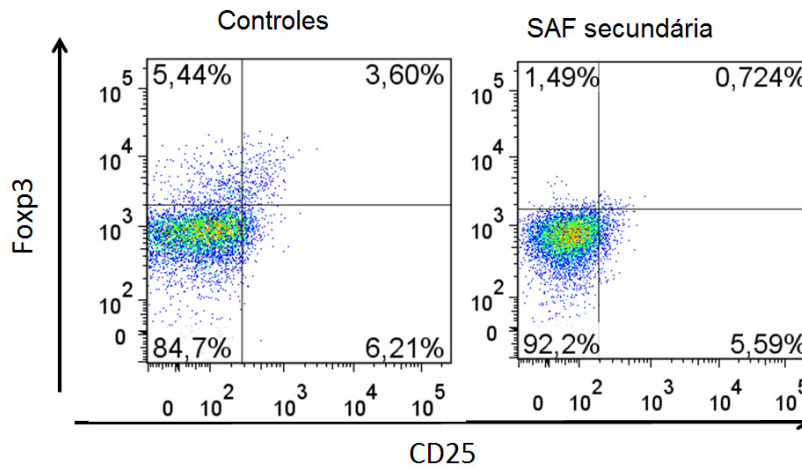


Figura 9: Marcação característica de células T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ em pacientes com síndrome antifosfolipídica (SAF) secundária e controles

A figura 10 ilustra uma marcação característica de células B $CD3^-CD19^+$ obtida de pacientes com SAF secundária e controles.

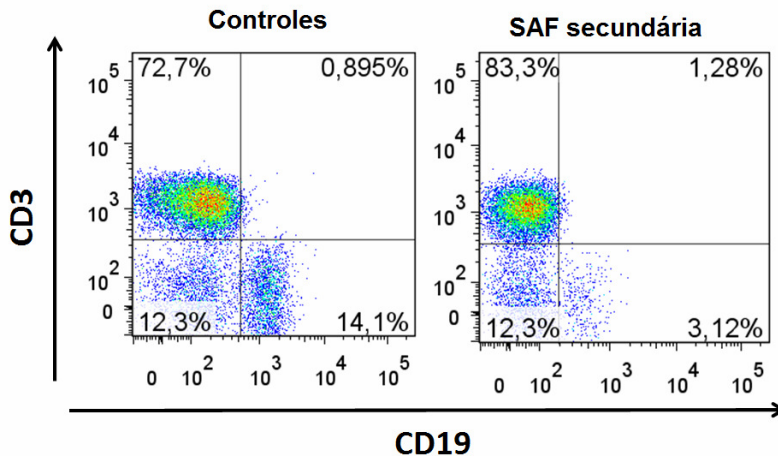


Figura 10: Marcação de células B $CD3^-CD19^+$ em pacientes com síndrome antifosfolipídica (SAF) secundária e controles

A figura 11 mostra a distribuição percentual dos linfócitos totais, linfócitos T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ e linfócitos B $CD3^-CD19^+$ em pacientes com SAF secundária e em controles sadios.

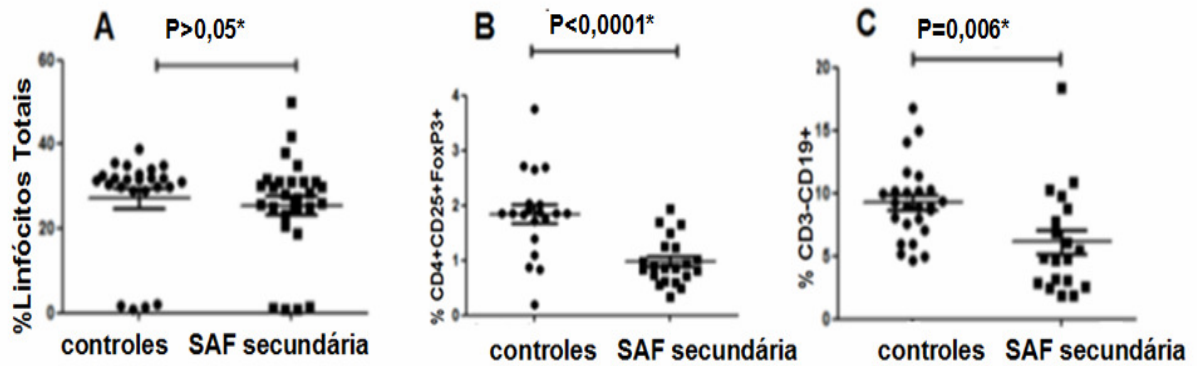


Figura 11: Distribuição gráfica percentual de linfócitos totais(A), células T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (B) e células B $CD3^+CD19^+$ (C) em controles e pacientes com síndrome antifosfolipídica secundária.

* Diferenças avaliadas pelo teste t de student

Analisou-se, também, a relação entre células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ e SLEDAI no grupo de pacientes com SAF secundária através do teste de Pearson. O resultado indica a existência de uma correlação negativa entre estas duas variáveis (quanto menor o número de células, maior o SLEDAI). Esta correlação é demonstrada na figura 12.

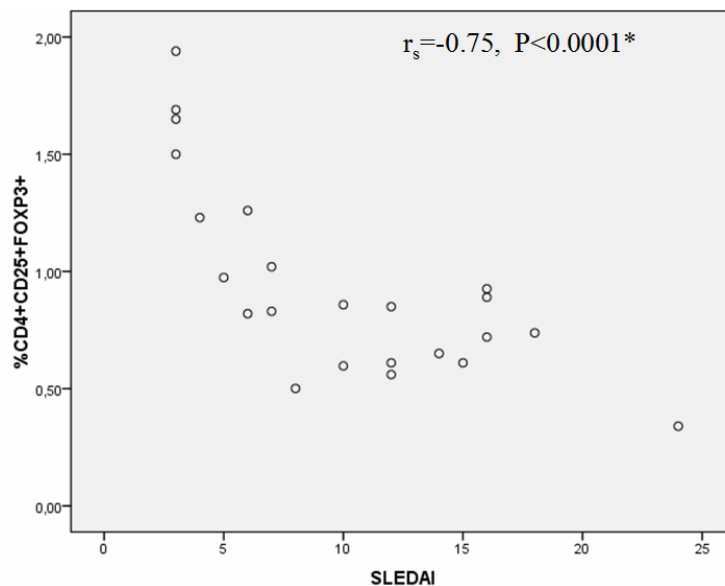


Figura 12: Relação entre percentual de células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ e índice de atividade da doença no LES (SLEDAI)

* r_s obtido pela correlação de Pearson e P pelo teste t de student

A relação de fármacos utilizados pelos pacientes com SAF primária e secundária foi também avaliada. A frequência de uso de anticoagulantes orais e/ou subcutâneos, antiagregantes plaquetários, metotrexato, hipocolesterolêmicos, antihipertensivos, antidepressivos, cálcio e inibidores da reabsorção óssea foi similar nos dois grupos. A utilização de cloroquina e/ou hidroxicloroquina, glicocorticóides e azatioprina foi significativamente mais frequente no grupo de pacientes com SAF secundária. A tabela 11 compara os medicamentos utilizados no pacientes com SAF primária e secundária.

Tabela 11: Distribuição de medicamentos em pacientes com síndrome antifosfolipídica (SAF) primária e secundária

Medicamentos	SAF primária n = 25	SAF secundária n = 25	P*
Anticoagulante oral n (%)	14 (56)	12 (48)	0,922
Antiagregante plaquetário n (%)	14 (56)	12 (48)	0,922
Enoxaparina n (%)	1 (4)	2 (8)	0,129
Cloroquina/ hidroxicloroquina n (%)	1 (4)	9 (36)	0,002
Glicocorticóides n (%)	8 (32)	16 (64)	0,002
Azatioprina n (%)	0 (0)	5 (20)	0,005
Antihipertensivo n (%)	5 (20)	4 (30)	0,711
Metotrexato n (%)	8 (32)	7 (28)	0,990
Hipocolesterolêmico n (%)	3 (12)	2 (8)	0,247
Antidepressivo n (%)	11 (44)	4 (16)	0,753
Cálcio n (%)	10(40)	9 (36)	0,060
Inibidores da reabsorção óssea n(%)	7 (28)	6 (24)	0,951

n: número amostral

* Teste de t do qui-quadrado ou Exato de Fisher

A associação entre número de células Treg circulantes e uso de azatioprina, cloroquina e glicocorticóides em pacientes com SAF secundária foi também avaliada. Não houve, para quaisquer destas análises, associação estatisticamente significativa: $P=0,23$ para azatioprina, $P=0,12$ para cloroquina e $P=0,29$ para os glicocorticoides (teste do qui-quadrado).

8 DISCUSSÃO

Há indícios suficientes do envolvimento das células Treg na regulação da resposta imune. É provável que defeitos na geração ou no funcionamento de células Treg contribuam significativamente para a patogênese de muitas doenças autoimunes. (175-178).

Entretanto, não há, até o momento, dados de literatura que abordem a relação entre células Treg e SAF. Neste estudo avaliamos, pela primeira vez, os níveis de linfócitos T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ e de linfócitos B $CD3^+CD19^+$ no sangue periférico de pacientes com SAF primária e secundária ao LES. Controles sadios pareados por sexo e idade foram utilizados na comparação das variáveis. A citometria de fluxo, através de marcadores específicos, nos permitiu uma análise quantitativa destas células.

Cinquenta pacientes com SAF (25 com SAF primária e 25 com SAF secundária ao LES) e 25 controles compreenderam a casuística do nosso estudo. Houve grande predominância do sexo feminino (92%) na população com SAF, principalmente no grupo com SAF secundária ao LES. Este dado está de acordo com diferentes estudos que relataram a predominância do sexo feminino, tanto na SAF primária, como na secundária (8, 179-180).

Na casuística total de pacientes com SAF, do presente estudo, predominaram adultos de meia-idade (média de idade ao redor de 44 anos), dado este acima da média encontrada em diferentes estudos, que relatam a doença em adultos mais jovens (181-182). Em termos laboratoriais, o anticorpo aCL foi o marcador mais prevalente (90%), enquanto trombose venosa profunda de membros inferiores ou superiores (66%) e óbitos fetais (15%) predominaram como achados clínicos, achados também compatíveis com a literatura (183-184). Na comparação de pacientes com SAF primária e secundária, não houve diferenças estatisticamente significantes quanto a achados clínicos, demográficos e laboratoriais.

Não foi realizada a análise de subtipos celulares na população global de SAF (50 pacientes), uma vez que tal análise envolveria o dobro do número de controles e considerável aumento do custo do estudo. Decidiu-se, assim, comparar separadamente as populações de pacientes com SAF primária e secundária em relação aos controles.

Em pacientes com SAF primária, a média dos valores de linfócitos totais foi significativamente menor do que a média dos controles; o significado deste achado é incerto e deve ser mais detalhado em estudos vindouros.

Documentamos significativa redução dos níveis circulantes de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ em pacientes com SAF primária em relação aos controles, seja percentualmente ou em números absolutos. Embora haja alguma controvérsia da literatura em relação à quantificação de linfócitos Treg em outras doenças autoimunes, nossos dados corroboram os resultados de vários estudos, onde o número de linfócitos Treg circulantes se encontra diminuído em relação a controles: é o caso de descrições em doenças como o LES (185-186), AR (112), SSp (136), granulomatose de Wegener (139), ES (150) e vasculites associadas aos ANCA (137-138).

A SAF secundária ocorre em pacientes com morbidades autoimunes definidas, como LES, AR, SS, EM e outras doenças (8, 187). A maioria dos pacientes com SAF secundária apresenta LES. É matéria de polêmica se LES e SAF são duas doenças concomitantes em um mesmo indivíduo, se o LES predispõe à SAF por constituir vasculopatia sistêmica ou, se ambos representam dois elementos de um mesmo processo patogênico (188-189). Neste contexto, foi realizado o estudo dos subtipos celulares em ambos os tipos de SAF, uma vez que possibilitaria compreender eventuais diferenças de comportamento celular nas duas situações clínicas.

Diferentemente do demonstrado em pacientes com SAF primária, o número de linfócitos totais de pacientes com SAF secundária não diferiu de forma significativa em

relação aos controles. O achado foi, de certa forma, inesperado uma vez que depleção linfocitária global não é rara no LES (190).

Também em pacientes com SAF secundária, foi demonstrada redução percentual e numérica de células Treg em relação aos controles saudáveis. Estes dados podem estar indicando um distúrbio quantitativo uniforme para pacientes com SAF como um todo. Entretanto, em pacientes com SAF secundária a depleção de linfócitos Treg é de mais complexa interpretação, já que pode estar primordialmente associada à atividade da doença lúpica.

Por questões de número amostral, não pudemos proceder a estratificação absoluta de pacientes com LES ativo e inativo na população com SAF secundária. Entretanto, a correlação de Pearson para níveis de células Treg circulantes e SLEDAI evidenciou que pacientes com doença mais ativa apresentavam um número significativamente mais baixo de linfócitos Treg. Este achado é concordante com a descrição de Mellor-Pita *et al* (191) e Cripin *at al* (192), que também demonstraram depleção de células Treg e correlação inversa entre atividade lúpica e número de células Treg circulantes; outros estudos, entretanto, não confirmaram tais achados em populações lúpicas (193-194).

Nossos dados acerca de depleção de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ em pacientes com SAF primária e secundária nos permitem hipotetizar que falhas na regulação da imunotolerância periférica por células supressoras estejam relacionadas, pelo menos parcialmente, ao processo etiopatogênico da SAF. Se a depleção de células Treg é

evento desencadeador de doença, ou apenas atua na perpetuação e exacerbação da mesma, é assunto ainda nebuloso.

De interesse, e de maneira inesperada, observamos em ambas as populações com SAF uma redução de linfócitos B CD3⁻CD19⁺ circulantes em relação a controles saudáveis. O significado desta depleção de células B na população com SAF, principalmente na forma primária, é enigmático.

Linfócitos B derivados da medula óssea são células produtoras de anticorpos. Sabe-se que alterações no desenvolvimento de linfócitos B podem dar origem a certos tipos de imunodeficiências primárias, mas também a neoplasias e doenças autoimunes, as últimas provavelmente decorrentes de escapes clonais (164).

Os mecanismos que levaram a depleção de células B nos pacientes com SAF primária e secundária podem incluir a ação de autoanticorpos dirigidos contra linfócitos B ou defeitos intrínsecos de subpopulações de células B. Digno de nota, células B competentes parecem desempenhar papel de importância no funcionamento de células Treg, como demonstram os achados obtidos em pacientes com imunodeficiência comum variável (195). De forma especulativa, pode-se inferir que a redução dos níveis de células B compreenda um dos mecanismos que levaram à depleção de linfócitos Treg nos pacientes com SAF.

A maioria da população-alvo deste estudo fazia uso de anticoagulantes e/ou antiagregantes plaquetários. No grupo com SAF secundária em particular, dois terços

dos pacientes estavam sob uso de corticóides, enquanto um terço usava cloroquina e um quinto dos pacientes utilizava azatioprina. Não observamos, entretanto, associação entre níveis circulantes de células Treg e uso destes fármacos. Similarmente, Zhang *et al* (194) reportaram ausência de associação entre níveis de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e uso de glicocorticóides e ciclofosfamida em pacientes com LES.

Embora praticamente não haja estudos abordando a relação entre número ou função Treg e SAF, há um estudo recente demonstrando que células mononucleares de sangue periférico de indivíduos normais, quando incubados com AAF, apresentam significativa redução quantitativa de células Treg, além de regulação positiva de células Th17; os dados sugerem fortemente que um desequilíbrio de populações Treg e Th17 possa estar associado à patogenicidade dos AAF (196).

Até o momento presente, a terapia-padrão utilizada na SAF tem-se fundamentado muito mais em anticoagulação do que em intervenções imunomoduladoras. Uma abordagem direta, deslocando o equilíbrio para favorecer Tregs, está sendo tentada através do uso de células Treg autólogas em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (197); se esta abordagem se consumará também em pacientes com SAF ou LES, apenas estudos futuros poderão responder. Também recentemente, células dendríticas feitas tolerantes inibiram respostas T CD4⁺ evocadas por β_2 GPI; o bloqueio destas respostas foi mediado por células Treg. Assim, células dendríticas tolerantes a autoantígenos poderão constituir alternativa terapêutica para doenças como a SAF através de modulação Treg (198).

A SAF é uma entidade *sui generis* dentro do grande espectro de doenças de autoimunidade, uma vez que prima muito mais por obstrução vascular trombótica do que propriamente por vasculite por complexos imunes (199). Enquanto muitas questões acerca da patogênese da SAF permanecem sem respostas definidas, é possível que a progressão para doença resulte de uma avaria na autotolerância periférica Treg-dependente.

Nosso estudo apresenta limitações que devem ser mencionadas. Embora amparada pelo cálculo amostral, uma casuística maior traria benefícios adicionais na análise estatística. O número amostral esteve, seguramente, restrito pelo alto custo dos marcadores celulares e da citometria de fluxo. Dada a população relativamente pequena, não foi possível subdividir os pacientes com SAF por características clínicas (obstétrica, tipos de trombose), o que traria dados de interesse em termos de subpopulações celulares. Não foi possível, também, uma estratificação absoluta em LES ativo e inativo em pacientes com SAF secundária. Por fim, os pacientes com SAF foram avaliados em fase pós-trombótica, o que restringe a interpretação de nossos resultados. Futuros estudos, preferencialmente longitudinais, deverão avaliar com mais detalhes o comportamento biológico das células Treg durante e após os eventos trombóticos.

Em conclusão, este estudo originalmente demonstrou, de forma homogênea, depleção de células Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ e de linfócitos B $CD3-CD19^+$ em pacientes com SAF primária e secundária. Uma possível relação destes achados com os fenômenos autoimunes vistos nesta afecção deve ser confirmada em estudos futuros.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ALARCON-SEGOVIA D, DELEZE M, ORIA CV, SANCHEZ-GUERRERO J, GOMEZ-PACHECO L, CABIEDES J, et al. *Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients.* Medicine (Baltimore). 1989 ;6:353-65.
2. MIYAKIS S, LOCKSHIN MD, ATSUMI T, BRANCH DW, BREY RL, CERVERA R, et al. *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS).* J Thromb Haemost. 2006;4:295-306.
3. LOCKSHIN M. *Antiphospholipid Antibody Syndrome.* In: RUDDY S, HARRIS ED, SLEDGE CB, editors. *Textbook of Rheumatology.* 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 1145-52.
4. GHARAVI AE, SAMMARITANO LR, WEN J, MIYAWAKI N, MORSE JH, ZARRABI MH, et al. *Characteristics of human immunodeficiency virus and chlorpromazine induced antiphospholipid antibodies: effect of beta 2 glycoprotein I on binding to phospholipid.* J Rheumatol. 1994;21:94-99.
5. NAHASS GT. *Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid antibody syndrome.* J Am Acad Dermatol. 1997;36:149-68.
6. WILSON WA, FAGHIRI Z, TAHERI F, GHARAVI AE. *Significance of IgA antiphospholipid antibodies.* Lupus. 1998;7:110-3.
7. CUCURULL E, GHARAVI AE, DIRI E, MENDEZ E, KAPOOR D, ESPINOZA LR. *IgA anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I are the most prevalent isotypes in African American patients with systemic lupus erythematosus.* Am J Med Sci. 1999;318:55-60.
8. CERVERA R, PIETTE JC, FONT J, KHAMASHTA MA, SHOENFELD Y, CAMPS MT, et al. *Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients.* Arthritis Rheum. 2002;46:1019-27.
9. GEZER S. *Antiphospholipid syndrome.* Dis Mon. 2003;49:696-741.
10. GINSBURG KS, LIANG MH, NEWCOMER L, GOLDBERGER SZ, SCHUR PH, HENNEKENS CH, et al. *Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis.* Ann Intern Med. 1992;117:997-1002.
11. STEPHENSON MD. *Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples.* Fertil Steril. 1996;66:24-9.

12. TAKEUCHI R, ATSUMI T, IEKO M, TAKEYA H, YASUDA S, ICHIKAWA K, et al. *Coagulation and fibrinolytic activities in 2 siblings with beta(2)-glycoprotein I deficiency*. Blood. 2000;96:1594-5.
13. GHARAVI AE, PIERANGELI SS. *Origin of antiphospholipid antibodies: induction of aPL by viral peptides*. Lupus. 1998;7: 52-4.
14. GHARAVI AE, SAMMARITANO LR, WEN J, ELKON KB. *Induction of antiphospholipid autoantibodies by immunization with beta 2 glycoprotein I (apolipoprotein H)*. J Clin Invest. 1992;90:1105-9.
15. SHOENFELD Y, SHERER Y, BLANK M. *Antiphospholipid syndrome in pregnancy--animal models and clinical implications*. Scand J Rheumatol Suppl. 1998;107:33-6.
16. MACKWORTH-YOUNG CG. *Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms*. Clin Exp Immunol. 2004;136:393-401.
17. ZANON E, SAGGIORATO G, RAMON R. *Anti-prothrombin antibodies as a potential risk factor of recurrent venous thromboembolism*. Thromb Haemost. 2004;91:255-8.
18. HOJNIK M, GEORGE J, ZIPOREN L, SHOENFELD Y. *Heart valve involvement (Libman-Sacks endocarditis) in the antiphospholipid syndrome*. Circulation. 1996;93:1579-87.
19. ASHERSON RA, CERVERA R, PIETTE JC, SHOENFELD Y, ESPINOSA G, PETRI MA, et al. *Catastrophic antiphospholipid syndrome: clues to the pathogenesis from a series of 80 patients*. Medicine (Baltimore). 2001;80:355-77.
20. DERKSEN RH, KHAMASHTA MA, BRANCH DW. *Management of the obstetric antiphospholipid syndrome*. Arthritis Rheum. 2004;50:1028-39.
21. PRADO AD do., PIOVESAN DM, STAUB HL, HORTA BL. *Association of anticardiolipin antibodies with preeclampsia: a systematic review and meta-analysis*. Obstet Gynecol. 2010;116:1433-43.
22. BORDON A, DUEYMES MY, LEVY Y. *Anti-endothelial cell anti-body binding makes negatively charged phospholipids accessible to antiphospholipid antibodies*. Arthritis Rheum. 1998;41:1738.
23. NAKAMURA N, BAN T, YAMAJI K, YONEDA Y, WADA Y. *Localization of the apoptosis-inducing activity of lupus anticoagulant in an annexin V-binding antibody subset*. J Clin Invest. 1998;101:1951-9.

24. SIMANTOV R, LA SALA JM, LO SK, GHARAVI AE, SAMMARITANO LR, SALMON JE, et al. *Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies*. J Clin Invest. 1995;96:2211-9.
25. PIERANGELI SS, LIU XW, BARKER JH, ANDERSON GH, HARRIS EN, GHARAVI AE, et al. *Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome*. Thromb Haemost. 1995;74:1361.
26. SHOENFELD Y, ZIPOREN L. *Lessons from experimental APS models*. Lupus. 1998;7 158-61.
27. SAMMARITANO LR, GHARAVI AE, SOBERANO C, LEVY RA, LOCKSHIN MD. *Phospholipid binding of antiphospholipid antibodies and placental anticoagulant protein*. J Clin Immunol. 1992;12:27-35.
28. ATSUMI T, KHAMASHTA MA, HAWORTH RS, BROOKS G, AMENGUAL O, ICHIKAWA K, et al. *Arterial disease and thrombosis in the antiphospholipid syndrome: a pathogenic role for endothelin 1*. Arthritis Rheum. 1998;41:800-7.
29. CARMO-PEREIRA S, BERTOLACCINI ML, ESCUDERO-CONTRERAS A, KHAMASHTA MA, HUGHES GR. *Value of IgA anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibody testing in patients with pregnancy morbidity*. Ann Rheum Dis. 2003;62:540-3.
30. SALMON JE, GIRARDI G. *The role of complement in the antiphospholipid syndrome*. Curr Dir Autoimmun. 2004;7:133-48.
31. ERKAN D, LOCKSHIN MD. *What is antiphospholipid syndrome?* Curr Rheumatol Rep. 2004;6:451-7.
32. CUADRADO MJ, HUGHES G. *Hughes (antiphospholipid) syndrome*. Clinical features. Rheum Dis Clin North Am. 2001;27:507-24.
33. PETRI M. *Pathogenesis and treatment of the antiphospholipid antibody syndrome*. Med Clin North Am. 1997;81:151-77.
34. SANTAMARIA JR, MANDELLI LM, BADZIAK D, CAVALIN LC, BARROS MF, SATO MS. *Antiphospholipid syndrome*. An Bras Dermatol. 2005;80:225-39.
35. HANLY JG. *Antiphospholipid syndrome: an overview*. CMAJ. 2003 Jun 24;168:1675-82.
36. MULINARI-BRENNER FA, PIZZOL ASD, MANFRINATO LC, SANTAMARIA JR, GEMELLI JJ. *Síndrome antifosfolípide*. An Bras Dermatol. 2000;75:219-24.

37. LEVINE JS, BRANCH DW, RAUCH J. *The antiphospholipid syndrome*. N Engl J Med. 2002;346:752-63.
38. ASHERSON RA, CERVERA R, PIETTE JC, FONT J, LIE JT, BURCOGLU A, et al. *Catastrophic antiphospholipid syndrome. Clinical and laboratory features of 50 patients*. Medicine (Baltimore). 1998;77:195-207.
39. CERVERA R, ESPINOSA G, BUCCIARELLI S, GOMEZ-PUERTA JA, FONT J. *Lessons from the catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS) registry*. Autoimmun Rev. 2006;6:81-4.
40. COSTEDOAT-CHALUMEAU N, ARNAUD L, SAADOUN D, CHASTRE J, LEROUX G, CACOUB P, et al. *Catastrophic antiphospholipid syndrome*. Rev Med Interne. 2012;33:194-9.
41. CERVERA R, GÓMEZ-PUERTA JA, ESPINOSA G, RED G, GIL V, RAMOS-CASALS M, et al. *"CAPS Registry": A review of 200 cases from the International Registry of patients with catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS)*. Ann Rheum Dis 2003;62:88.
42. SATO EI, BONFÁ ED, COSTALLT LTL, SILVA NA, BRENOL JCT, SANTIAGO MB, et al. *Lúpus Eritematoso Sistêmico: Tratamento do Acometimento Cutâneo/articular*. Sociedade Brasileira de Reumatologia Projeto Diretrizes 2004.
43. SATO EI. *Lupus eritematoso sistêmico*. In: UNIFESP, editor. *Guia de Reumatologia*. Baureri: Manole; 2004. p. 139-54.
44. HAHN BH. *Lupus eritematoso sistêmico*. In: FAUCI AS, BRAUNWALD E, KASPER D, HAUSER SL, LONGO DL, JAMESON L, editors. *Harrison: Medicina Interna*. 17 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2008.
45. D'CRUZ DP, KHAMASHTA MA, HUGHES GR. *Systemic Lupus erythematosus*. Lancet 2007;396:587-96.
46. CASSIDY JT, PETTY RE. *Systemic lupus erythematosus*. In: CASSIDY JT, PETTY RE, editors. *Textbook of Pediatric Rheumatology*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2001. p. 218-321.
47. BADER-MEUNIER B, QUARTIER P, DESCHÊNES G. *Childhood-onset systemic lupus erythematosus*. Arch Pediatr. 2003;10:147-57.
48. VILAR MJ, RODRIGUES JM, SATO EI. *Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN – Brasil*. Rev Bras Reumatol 2003;43:347-51.
49. VASUDEVAN A, KRISHNAMURTHY AN. *Changing worldwide epidemiology of systemic lupus erythematosus*. Rheum Dis Clin North Am. 2010;36:1-13.

50. FREIRE BFA, SILVA RC, FABRO AT, SANTOS DC. *Lupus eritematoso sistêmico: novo fator de risco para aterosclerose?* Arq Bras Cardiol. 2006;87:300-6.
51. HAN GM, O'NEIL-ANDERSEN NJ, ZURIER RB, LAWRENCE DA. *CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis.* Cell Immunol. 2008;253:92-101.
52. JOHSSON H, NIVED O, STURFELT G. *Outcome of systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population.* Medicine (Baltimore). 1989;68:141-50.
53. LUSIS AJ, MAR R, PAJUKANTA P. *Genetics of atherosclerosis.* Annu Rev Genomics Hum Genet. 2004;5: 189-218.
54. WICH G, KNOFLACH M, XU Q. *Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis.* Ann Rev Immunol. 2004;22:361-403.
55. WILSON PW, D'AGOSTINO RB, LEVY D, BELANGER AM, SILBERSHASTZ H. *Prediction of coronary heart disease using risk.* Circulation. 1998;97:837-47.
56. CARVALHO JC, BONFÁ E, BORBA EF. *Lupus erythematosus systemic and "lupus dyslipoproteinemia".* Autoimmune Rev. 2008;7:246-50.
57. MACGREGOR A, DHILLON VB, BINDER A, FORTE CA, KNIGHT BC, BETTERIDGE DJ, et al. *Fasting lipids and anticardiolipin antibodies as risk factors for vascular disease in systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis 1992;51:152-55.
58. HOCHBERG MC. *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum 1997;40:1725.
59. BOMBARDIER C, GLADMAN DD, UROWITZ MB, CARON D, CHANG CH. *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients.* The Committee on Prognosis Studies in SLE. Arthritis Rheum. 1992;35:630-40.
60. LIANG MH, SOCHER SA, LARSON MG, SCHUR PH. *Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum. 1989;32:1107-18.
61. VITALI C, BENCIVELLI W, ISENBERG DA, SMOLEN JS S, M.L., SCIUTO M, NERI R, et al. *Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score.* The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. Clin Exp Rheumatol 1992 10:541-7.

62. SYMMONS DP, COPPOCK JS, BACON PA, BRESNIHAN B, ISENBERG DA, MADDISON P, et al. *Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus*. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). *Q J Med*. 1988;69:927-37.
63. GLADMAN DD, IBANEZ D, UROWITZ MB. *Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000*. *J Rheumatology*. 2002;29:288-91.
64. MUELLER DL. *Mechanisms maintaining peripheral tolerance*. *Nat Immunol*. 2010;11:21-7.
65. PARISH IA, HEATH WR. *Too dangerous to ignore: self-tolerance and the control of ignorant autoreactive T cells*. *Immunology Cell Biology*. 2008 2008;86:145-52.
66. BAXTER AG, HODGKIN PD. *Activation rules: the two-signal theories of immune activation*. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:439-46.
67. VON BOEHMER H, MELCHERS F. *Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease*. *Nat Immunol*. 2010;11:14-20.
68. KYEWSKI B, KLEIN L. *A central role for central tolerance*. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:571-606.
69. NEMAZEE D. *Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance*. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:728-40.
70. BANDYOPADHYAY S, SOTO-NIEVES S, MACIAN F. *Transcriptional regulation of T cell tolerance*. *Seminars in Immunology*. 2009;19:180-7.
71. CAMPBELL BJ, KOCH MA. *Phenotypic and functional specialization of FoxP3+ regulatory T cells*. *Natures Reviews Immunology*. 2011;11:119-30
72. BIDERE N, SU HC, LENARDO MJ. *Genetic disorders of programmed cell death in the immune system*. *Annual Review of Immunology*. 2006;24:321-52.
73. STRASSER A, PUTHALAKATH H, O'REILLY LA, BOUILLET P. *What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain*. *Immunol Cell Biol*. 2008;86:57-66.
74. SINGH NJ, SCHWARTZ RH. *Primer: mechanisms of immunologic tolerance*. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:44-52.
75. ABBAS AK, LICHTMAN AH, SHIV P. *Tolerância Imunológica e Autoimunidade. Imunologia Celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora S.A.; 2011. p. 319-43.

76. JANULEIT H, SCHMITT E. *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations*. J Immunol. 2003;171:6323-7.
77. SURI-PAYER E, AMAR AZ, THORNTON AM, SHEVACH EM. *CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells*. J Immunol. 1998;160:1212-8.
78. FUKAURA H, KENT SC, PIETRUSEWICZ MJ, KHOURY SJ, WEINER HL, HAFLER DA. *Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta 1 secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients*. J Clin Invest. 2005;98:70-7.
79. BAECHEER-ALLAN C, BROWN JA, FREEMAN GJ, HAFLER DA. *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol. 2001;167:1245-53.
80. SHEVACH EM. *CD4+CD25+ suppressor cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol. 2002;2:389-400.
81. SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, ASANO M, ITOH M, TODA M. *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol. 1995;155:1151-54.
82. MCHUGH RS, WHITTERS MJ, PICCIRILLO CA, YOUNG DA, SHEVACH EM, COLLINS M, et al. *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. Immunity. 2002;16:311-23.
83. TAKAHASHI T, TAGAMI T, YAMAZAKI S, UEDE T, SHIMIZU J, SAKAGUCHI N, et al. *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med. 2000;192:303-10.
84. 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;203:1701-11.
85. AKBAR AN, VUKMANOVIC-STEJIC M, TAAMS LS, MACALLAN DC. *The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery*. Nat Rev Immunol. 2007;7:231-7.
86. BRUNKOW ME, JEFFERY EW, HJERRILD KA, PAEPER B, CLARK LB, YASAYKO SA, et al. *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet. 2001;27:68-73.
87. FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol. 2003;4:330-6.

88. MIYARA M, GOROCHOV G, EHRENSTEIN M, MUSSET L, SAKAGUCHI S, AMOURA Z. *Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases*. *Autoimmun Rev*. 2011;10:744-55.
89. SAKAGUCHI S, WING K, MIYARA M. *Regulatory T cells - a brief history and perspective*. *Eur J Immunol*. 2007;37:116-23.
90. SALOMON B, LENSCHOW DJ, RHEE L, ASHOURIAN N, SINGH B, SHARPE A, et al. *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. *Immunity*. 2000;12:431-40.
91. READ S, MALMSTROM SV, POWRIE PF. *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation*. *J Exp Med*. 2000;192:295-302.
92. SHEVACH EM. *Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. *Immunity*. 2009;30:636-45.
93. SANSOM DM, WALKER LS. *The role of CD28 and CTLA-4 in regulatory T cells in the human immune system*. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10:490-500.
94. WING K, ONISHI Y, PRIETO-MARTIN P, YAMAGUCHI T, MIYARA M, FEHERVARI Z, et al. *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. *Science*. 2008;322:271-5.
95. READ S, GREENWALD R, IZCUE A, ROBINSON N, MANDELBROT D, FRANCISCO L, et al. *Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo*. *J Immunol*. 2006;177:4376-83.
96. LA ROSA M de, RUTZ S, DORNINGER H, SCHEFFOLD A. *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. *Eur J Immunol*. 2004;34:2480-8.
97. SOJKA DK HY, FOWELL DJ. *Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target*. *Immunology*. 2008;124:13-22.
98. GONSETTE RE. *Self-tolerance in multiple sclerosis*. *Acta Neurol Belg*. 2012;112:133-40.
99. RICHER MJ, LAVALLE DJ, SHANINA I, HORWITZ MC. *Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFβ1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes*. *PLoS One*. 2012;7:e31153.
100. CVETANOVICH GL, HAFLER DA. *Human Regulatory T Cells in Autoimmune Diseases*. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:753-60.

101. COSTANTINO CM, BAECHEER-ALLAN CM, HAFLEER DA. *Human regulatory T cells and autoimmunity*. Eur J Immunol. 2008;38:921-4.
102. BELKAID Y, ROUSE BT. *Natural regulatory T cells in infectious disease*. Nat Immunol 2005;6:353-60.
103. CURIEL TJ. *Tregs and rethinking cancer immunotherapy*. J Clin Invest. 2007;117:1167-74.
104. SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, ONO M. *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell. 2008;133:775-87.
105. CAO D, VAN VOLLENHOVEN R, KLARESKOG L, TROLLMO C, MALMSTROM V. CD25BRIGHTCD4⁺ REGULATORY T CELLS ARE ENRICHED IN INFLAMED JOINTS OF PATIENTS WITH CHRONIC RHEUMATIC DISEASE. Arthritis Res Therm. 2004;6:355-46.
106. JIAO Z, WANG W, JIA R, LI J, YOU H, CHEN I. *Accumulation of FoxP3-expressing CD4⁺CD25⁺ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol. 2007;36:428-33.
107. TOUBI E, KESSEL A, MAHMUDOV Z, HALLAS K, ROSNER I. *Increased spontaneous apoptosis of CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab*. Ann N Y Sci. 2005;1051:506-14.
108. ALVARADO-SANCHEZ B, HERNANDEZ-CASTRO B, PORTALES-PEREZ D, BARANDA L, LAYSECA-ESPINOSA E, ABUD-MENDONZA C. *Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. J Autoimmun. 2006;27:110-8.
109. AERTS NE, DOMBRECHT EJ, EBO DG, BRIDTS CH, STEVENS WJ, De CLERCK LS. *Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis*. Cell Immunol. 2008;251:109-15.
110. KAO JK, HSUE YT, LIN CY. *Role of new population of peripheral CD11c⁽⁺⁾CD8⁽⁺⁾ T cells and CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells during remissions stages in rheumatoid arthritis patients*. J Microbiol Immunol 2007;40:419-27.
111. VAN AMELSFORT JM, JACOBS KM, BIJLSMA JW, LAFEBER FP, TAAMS LS. *CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid*. Arthritis Rheum 2004;50:2775-85.
112. LAWSON CA, BROWN AK, BEJARANO, DOUGLAS SH, BURGOYNE CH, GREENSTEIN AS, et al. *Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell population in peripheral blood*. Rheumatology (Oxford). 2006;45:1210-7.

113. LIU MF, WANG CR, FUNG LL, LIN LH, TSAI CN. *The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.* Scand J Immunol 2005;62:312-7.
114. LIN SC, CHEN KH, LIN CH, KUO CC, LING QD, CHAN CH. *The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients.* Eur J Clin Invest. 2007;37:987-96.
115. MÖTTÖNEN M, HEIKKINEN J, MUSTONEN L, ISOMÄKI P, LUUKKAINEN R, LASSILA O. *CD4+CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.* Clin Exp Immunol. 2005;140:360-7.
116. VAN AMELSFORT JM, VAN ROON JA, NOORDEGRAAF M, JACOBS KM, BIJLSMA JW, LAFEBER FP. *Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+, CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 2007;56:732-42.
117. VAN ROON JA, HARTGRING SA, VAN DER WURFF-JACOBS KM, BIJLSMA J, LAFEBER FP. *Numbers of CD25+Foxp3+ T cells that lack the IL-7 receptor are increased intraarticularly and have impaired suppressive function in RA patients.* Rheumatology (Oxford) 2010;8:389-93.
118. FLORES-BORJA F, JURY EC, MAURI C, EHRENSTEIN MR. *Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis.* Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:19396–401.
119. NOTLEY CA, INGLIS JJ, ALZABIN S, MCCANN FE, MCNAMEE KE, WILLIAMS RO. *Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells.* J Exp Med. 2008;205:2491-7.
120. 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;175:8392-400.
121. BARATH S, ALEKSZA M, TARR T, SIPKA S, SZEGEDI G, KISS E. *Measurement of natural (CD4+CD25high) and inducible (CD4+IL-10+) regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus.* Lupus. 2007;16:489-96.
122. 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;20:861-8.
123. BONELLI M, VON DALWIGK K, SAVITSKAYA A, SMOLEN JS, SCHEINECKER C. *Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis.* Ann Rheum Dis. 2008;67:664-71.

124. YANG HX, ZHANG W, ZHAO LD, LI Y, ZHANG FC, TANG FL, et al. *Are CD4+CD25-Foxp3+ cells in untreated new-onset lupus patients regulatory T cells?* Arthritis Res Ther. 2009;11:153.
125. BARRETO M, FERREIRA RC, LOURENCO L, MORAES-FONTES MF, SANTOS E, ALVES M, et al. *Low frequency of CD4+CD25+ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGFbeta gene variants.* BMC Immunol. 2009;10:5.
126. AZAB NA, BASSYOUNI IH, EMAD Y, ABD EL-WAHAB GA, HAMDY G, MASHAHIT MA. *CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids.* Clin Immunol. 2008;127:151-7.
127. HORWITZ DA. *Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in SLE.* Arthritis Res Ther. 2010;12:101.
128. BONELLI M, SAVITSKAYA A, STEINER CW, RATH E, SMOLEN JS, SCHEINECKER C. *Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus.* J Immunol. 2009;182:1689-95.
129. GAVIN MA, TORGERSON TR, HOUSTON E, DEROOS P, HO WY, STRAY-PEDERSEN A, et al. *Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:6659-64.
130. SARIGUL M, YAZISIZ V, BASSORGUN CI, ULKER M, AVCI AB, ERBASAN F, et al. *The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome.* Lupus. 2010;19:138-45.
131. TAFLIN C, MIYARA M, NOCHY D, VALEYRE D, NACCACHE JM, ALTARE F, et al. *FoxP3+ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions.* Am J Pathol. 2009;174:497-508.
132. FRANZ B, FRITZSCHING B, RIEHL A, OBERLE N, KLEMKE CD, SYKORA J, et al. *Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus.* Arthritis Rheum. 2007;56:1910-20.
133. LIU MF, WANG CR, FUNG LL, WU CR. *Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus.* Scand J Immunol 2004;59:198-202.
134. CHRISTODOULOU MI, KAPSOGEOURGOU EK, MOUTSOPOULOS NM, MOUTSOPOULOS HM. *Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors.* Am J Pathol. 2008;173:1389-96.

135. GOTTENBERG JEL, F., ABBED K, GASNAULT J, LE NEVOT E, DELFRAISSY JF, TAOUFIK Y, et al. *CD4 CD25high regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjögren's syndrome*. J Autoimmun. 2005;24:235-42.
136. LI X, QIAN L, WANG G, ZHANG H, WANG X, CHEN K, et al. *T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome*. J Rheumatol. 2007;34:2438-45.
137. ABDULAHAD WH, STEGEMAN CA, VAN DER GELD YM, DOORNBOS-VAN DER MEER B, LIMBURG PC, KALLENBERG CG. *Functional defect of circulating regulatory CD4+ Tcells in patients with Wegener's granulomatosis in remission*. Arthritis Rheum. 2007;56:2080–91.
138. MARINAKI S, NEUMANN I, KALSCH AI, GRIMMINGER P, BREEDIJK A, BIRCK R, et al. *Abnormalities of CD4 T cell subpopulations in ANCA-associated vasculitis*. Clin Exp Immunol. 2005;140:181-91.
139. MORGAN MD, DAY CJ, PIPER KP, KHAN N, HARPER L, MOSS PA. *Patients with Wegener's granulomatosis demonstrate a relative deficiency and functional impairment of T-regulatory cells*. Immunology 2010;130:64–73.
140. KLAPA S, MUELLER A, CSERNOK E, FAGIN U, KLENERMAN P, HOLL-ULRICH K. *Lower numbers of FoxP3 and CCR4 co-expressing cells in an elevated subpopulation of CD4+CD25high regulatory T cells from Wegener's granulomatosis*. Rheumatology 2010;28:72-80.
141. BOYER O, SAADOUN D, ABRIOL J, DODILLE M, PIETTE JC, CACOUB P, et al. *CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis*. Blood. 2004;103:3428-30.
142. CHAVELE KM, SHUKLA D, KETEEPE-ARACHI T, SEIDEL JA, FUCHS D, PUSEY CD. *Regulation of myeloperoxidase-specific T cell responses during disease remission in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: the role of Treg cells and tryptophan degradation*. Arthritis Rheum. 2010;62:1539–48.
143. RIMBERT M, HAMIDOU M, BRAUDEAU C, PUECHAL X, TEIXEIRA L, CAILLON H. *Decreased numbers of blood dendritic cells and defective function of regulatory T cells in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis*. PLoS One. 2011;6:e18734.
144. ALLENBACH Y, SOLLY S, GREGOIRE S, DUBOURG O, SALOMON B, BUTLER-BROWNE G, et al. *Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis*. Am J Pathol. 2009;174:989-98.
145. WASCHBISCH A, SCHWAB N, RUCK T, STENNER MP, WIENDL H. *FOXP3+ T regulatory cells in idiopathic inflammatory myopathies*. J Neuroimmunol. 2010;225:137-42.

146. REZVANI K, MIELKE S, AHMADZADEH M, KILICAL Y, SAVANI BN, ZEILAH J, et al. *High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT*. Blood. 2006;108:1291-7.
147. TRENADO A, CHARLOTTE F, FISSON S, YAGELLO M, KLATZMANN D, SALOMON BL, et al. *Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia*. J Clin Invest. 2003;112:1688-96.
148. RADSTAKE TR, VAN BON L, BROEN J, WENINK M, SANTEGOETS K, DENG Y, et al. *Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression*. PLoS One. 2009;4:e5981.
149. BROEN JC, WOLVERS-TETTERO IL, GEURTS-VAN BON L, VONK MC, COENEN MJ, LAFYATIS R, et al. *Skewed X chromosomal inactivation impacts T regulatory cell function in systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis. 2010;69:2213-6.
150. ANTIGA E, QUAGLINO P, BELLANDI S, VOLPI W, DEL BIANCO E, COMESSATTI A, et al. *Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea*. Br J Dermatol. 2010;162:1056-63.
151. MICHELS-VAN AMELSFORT JM, WALTER GJ, TAAMS LS. *CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic sclerosis and other rheumatic diseases*. Expert Rev Clin Immunol. 2011;7:499-514.
152. SLOBODIN G, AHMAD MS, ROSNER I, PERI R, ROZENBAUM M, KESSEL A, et al. *Regulatory T cells (CD4(+)CD25(bright)FoxP3(+)) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity*. Cell Immunol. 2010;261:77-80.
153. GOODNOW CC. *Multistep pathogenesis of autoimmune disease*. Cell. 2007;130:25-35.
154. VON BOEHMER H, MELCHERS F. *Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease*. Nat Immunol. 2010;11:14-20.
155. WARDEMANN H, NUSSENZWEIG MC. *B-cell self-tolerance in humans*. Adv Immunol. 2007;95:83-110.
156. BASTEN A. *The role of B cells in transplantation and immunopathic diseases*. Immune Netw. 2010;1:81-4.
157. PHAN TG, GRAY EE, CYSTER JG. *The microanatomy of B cell activation*. Curr Opin Immunol. 2009;21:258-65.
158. COX SL, SILVEIRA PA. *Emerging roles for B lymphocytes in Type 1 diabetes*. Expert Rev Clin Immunol. 2009;5:311-24.

159. YANABA K, BOUAZIZ JD, MATSUSHITA T, MAGRO CM, ST CLAIR EW, TEDDER TF. *B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease*. Immunol Rev. 2008;223:284-99.
160. SINGH A, CARSON WFT, SECOR ER, JR., GUERNSEY LA, FLAVELL RA, CLARK RB, et al. *Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease*. J Immunol. 2008;180:7318-26.
161. DILILLO DJ, MATSUSHITA T, TEDDER TF. *B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer*. Ann N Y Acad Sci. 2010;1183:38-57.
162. BLAIR PA, NORENA LY, FLORES-BORJA F, RAWLINGS DJ, ISENBERG DA, EHRENSTEIN MR, et al. *CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients*. Immunity. 2010 Jan;32:129-40.
163. MAURI C, BOSMA A. *Immune Regulatory Function of B Cells*. Annu Rev Immunol. 2012;30:221-41.
164. DÖRNER T, LIPSKY PE. *Signalling pathways in B cells: implications for autoimmunity*. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;305:213-40.
165. MANIATI E, POTTER P, ROGERS NJ, MORLEY BJ. *Control of apoptosis in autoimmunity*. J Pathol. 2008 Jan;214:190-8.
166. SILVEIRA PA, DOMBROWSKY J, JOHNSON E, CHAPMAN MHD. *B cell selection defects underlie the development of diabetogenic APCs in nonobese diabetic mice*. J Immunol. 2004;172:5086-94.
167. GAVANESCU I, BENOIST C, MATHIS D. *B cells are required for Aire-deficient mice to develop multi-organ autoinflammation: A therapeutic approach for APECED patients*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:13009-14.
168. HU C, WONG FS, WEN L. *Translational Mini-Review Series on B Cell-Directed Therapies: B cell-directed therapy for autoimmune diseases*. Clin Exp Immunol. 2009;157:181-90.
169. MARINO E, VILLANUEVA J, WALTERS S, LIUWANTARA D, MACKAY F, GREY ST. *CD4(+)/CD25(+) T-cells control autoimmunity in the absence of B-cells*. Diabetes. 2009;58:1568-77.
170. JONSSON R, VOGELSANG P, VOLCHENKOV R, ESPINOSA A, WAHRENHERLENIUS M, APPEL S. *The complexity of Sjogren's syndrome: novel aspects on pathogenesis*. Immunol Lett. 2011;141:1-9.

171. LA CAVA A. *The busy life of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus*. *Discov Med*. 2009;8:13-7.
172. TINCANI A, ANDREOLI L, CHIGHIZOLA C, MERONI PL. *The interplay between the antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus*. *Autoimmunity*. 2009;24:257-9.
173. COCA A, SANZ I. *B cell depletion in lupus and Sjögren's syndrome: an update*. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21:483-8.
174. KLINKER MW, LUNDY SK. *Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes*. *Mol Med*. 2012;18:123-37.
175. DAMOISEAUX J. *Regulatory T cells: back to the future*. *Neth J Med*. 2006 ;64:4-9.
176. ASCHENBRENNER K, D'CRUZ LM, VOLLMANN EH, HINTERBERGER M, EMMERICH J, SWEE LK. *Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+medullary thymic epithelial cells*. *Nat Immunol*. 2007;8:351-8.
177. MIYARA M, WING K, SAKAGUCHI S. *Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion*. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:749-55.
178. NOMURA T, SAKAGUCHI S. *Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance*. *Nat Immunol*. 2007;8:333-4.
179. CERVERA R, KHAMASHTA MA, HUGHES GR. *The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe*. *Lupus*. 2009;18:869-74.
180. REES JD, S. LANÇA, P. V. MARQUES, J.A. GÓMEZ-PUERTA, R. MOCO, C. OLIVERI, et al. *Prevalence of the antiphospholipid syndrome in primary systemic vasculitis*. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:109–11.
181. LIM W, CROWTHER MA. *Antiphospholipid antibodies: a critical review of the literature*. *Curr Opin Hematol*. 2007 Sep;14(5):494-9.
182. BREY RL. *Antiphospholipid antibodies in young adults with stroke*. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2005;20:105-12.
183. ATANASSOVA PA. *Antiphospholipid Syndrome and Vascular Ischemic (Occlusive) Diseases: An Overview*. *Yonsei Med J* 2007;48:901-26.
184. SANGLE NA, PATH FCR, SMOCK KJ. *Antiphospholipid Antibody Syndrome*. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135:1092-96.

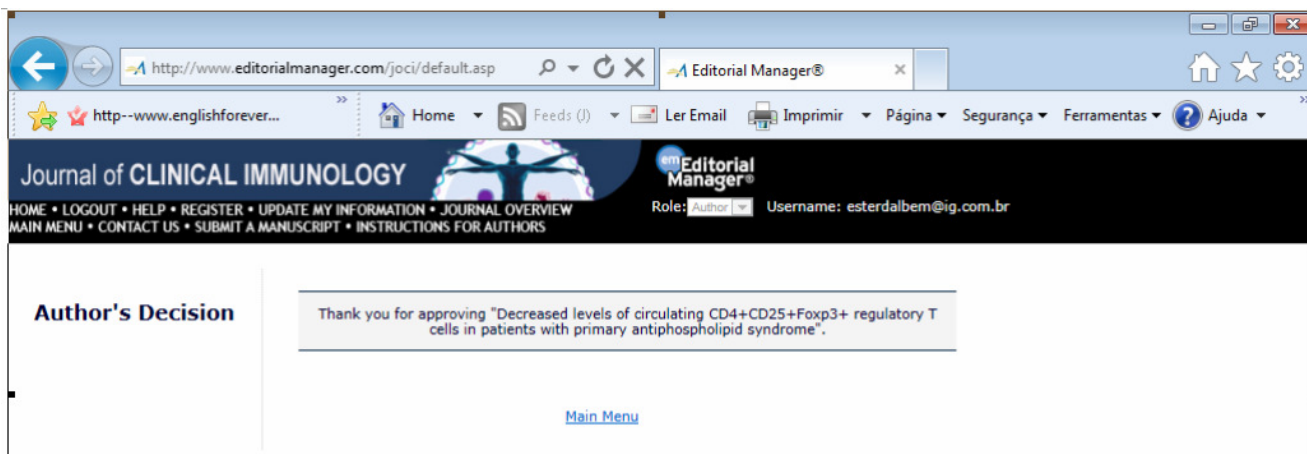
185. HENRIQUES A, INES L, COUTO M, PEDREIRO S, SANTOS C, MAGALHAES M, et al. *Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus*. Cell Immunol. 2010;264:97-103.
186. SUEN JL, LI HT, JONG YJ, CHIANG BL, YEN JH. *Altered homeostasis of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus*. Immunology. 2009;127:196-205.
187. DAY HM, THIAGARAJAN P, AHN C, REVEILLE JD, TINKER KF, ARNETT FC. *Autoantibodies to beta2-glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome: clinical correlations in comparison with other antiphospholipid antibody tests*. J Rheumatol. 1998;25:667-74.
188. GIRARDI G, REDECHA P, SALMON JE. *Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation*. Nat Med. 2004;10:1222-6.
189. SALMON JE, HOLERS VM. *Complement activation as a mediator of antiphospholipid antibody induced pregnancy loss and thrombosis*. Ann Rheum Dis. 2002;61:46-50.
190. LEANDRO MJ, EDWARDS JC, CAMBRIDGE G, EHRENSTEIN MR, ISENBERG DA. *An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum. 2002;46:2673-7.
191. MELLOR-PITA S, CITORES MJ, CASTEJON R, TUTOR-URETA P, YEBRA-BANGO M, ANDREU JL, et al. *Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis. 2006;65:553-4.
192. CRISPIN JC, MARTINEZ A, ALCOCER-VARELA J. *Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. J Autoimmun. 2003;2:273-6.
193. YATES J, WHITTINGTON A, MITCHELL P, LECHLER RI, LIGHTSTONE L, LOMBARDI G. *Natural regulatory T cells: number and function are normal in the majority of patients with lupus nephritis*. Clin Exp Immunol. 2008;153:44-55.
194. 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;67:1037-40.
195. GENRE J, ERRANTE PR, KOKRON CM, TOLEDO-BARROS M, CÂMARA NO, RIZZO LV. *Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with common variable immunodeficiency: a link to autoimmunity?* Clin Immunol. 2009;132:215-21.
196. XIAO J, ZHU F, LIU X, XIONG J. *Th1/Th2/Th17/Treg expression in cultured PBMCs with antiphospholipid antibodies*. Mol Med Report. 2012;6:1035-9.

197. THOMPSON JA, PERRY D, BRUSKO TM. *Autologous regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes*. Curr Diab Rep. 2012;12:623-32.

198. TORRES-AGUILAR H, BLANK M, KIVITY S, MISGAV M, LUBOSHITZ J, PIERANGELI SS, et al. *Tolerogenic dendritic cells inhibit antiphospholipid syndrome derived effector/memory CD4(+) T cell response to beta2GPI*. Ann Rheum Dis. 2012;71:120-8.

199. FISCHER MJ, RAUCH J, LEVINE JS. *The antiphospholipid syndrome*. Semin Nephrol. 2007;27:35-46.

10 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO AO JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY



The screenshot shows a web browser window with the URL <http://www.editorialmanager.com/joci/default.asp>. The page header includes the Journal of CLINICAL IMMUNOLOGY logo and the Editorial Manager logo. The user is logged in as 'Author' with the username 'esterdalbem@ig.com.br'. The main content area displays an 'Author's Decision' message: 'Thank you for approving "Decreased levels of circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with primary antiphospholipid syndrome".' Below the message is a link to the 'Main Menu'.

Journal of CLINICAL IMMUNOLOGY

Editorial Manager®

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS


Role: Author | Username: esterdalbem@ig.com.br

Author's Decision

Thank you for approving "Decreased levels of circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with primary antiphospholipid syndrome".

[Main Menu](#)

11 DECISÃO EDITORIAL DO JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY

Journal of CLINICAL IMMUNOLOGY  Editorial Manager®

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author | Username: esterdalbem@ig.com.br

Submissions with an Editorial Office Decision for Author Ester Rosári Raphaelli Dal Ben, Ms.

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Dispo
Action Links	JOCI-D-12-02275	Decreased levels of circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with primary antiphospholipid syndrome	Nov 22, 2012	Dec 17, 2012	Accept	Dec 17, 2012	Accept

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

You should use the free Adobe Reader 10 or later for best PDF Viewing results.



12 ARTIGO SUBMETIDO AO JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY

(FATOR DE IMPACTO: 3,077)

NCBI Resources How To

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed

[Display Settings:](#) Abstract [Send to:](#)

J Clin Immunol. 2013 Jan 29. [Epub ahead of print]

Decreased Levels of Circulating CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells in Patients with Primary Antiphospholipid Syndrome.

[Dal Ben ER](#), [do Prado CH](#), [Baptista TS](#), [Bauer ME](#), [Staub HL](#).

Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

Abstract

INTRODUCTION: CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T (Treg) cell dysfunction has been documented in various autoimmune disorders, but not in antiphospholipid syndrome (APS) so far.

METHODS: In this cross-sectional study, we aim to investigate CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells, CD3(+)CD19(-) T cells and CD3(-)CD19(+) B cells in patients with primary APS and healthy controls. Cell subtypes were immunophenotyped using specific monoclonal antibodies (anti-CD3 CY5, anti-CD4 FITC, anti-CD25, anti-Foxp3, anti-CD19 PE) and flow cytometry.

RESULTS: Twenty patients with APS and 20 age- and sex-matched controls were studied. The percentage of total lymphocytes, activated Th cells (CD4+CD25+), Treg cells and CD3(-)CD19(+) B cells were found significantly lower in APS patients as compared to controls (all $p < 0.05$).

CONCLUSION: A dysfunction in CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells may represent one of the mechanisms leading to autoimmunity in APS patients. The decreased number of CD3(-)CD19(+) B cells of APS patients warrants further elucidation.

PMID: 23354908 [PubMed - as supplied by publisher]

LinkOut - more resources

Decreased levels of circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with primary antiphospholipid syndrome

Ester Rosári Raphaelli Dal Ben¹, Carine Hartmann do Prado¹, Talita Siara Almeida Baptista¹,
Moisés Evandro Bauer¹, and Henrique Luiz Staub²

¹Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil. ²Rheumatology Department, Saint Lucas Hospital of PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Henrique Luiz Staub. Rheumatology Department, Saint Lucas Hospital of PUCRS. Av. Ipiranga, 6690/220, Porto Alegre 90610-000, Brazil. Telephone: 0055(51)-3320-5057 Fax: 0055(51)-3328-8111 E.mail: reumatoacademico@gmail.com

Key messages:

- The primary APS is a systemic thrombotic disorder of unknown etiopathogenesis;
- Depletion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in primary APS might be of pathogenic relevance;
- A parallel decrease of circulating CD3⁻CD19⁺ B cells in APS demands clarification.

ABSTRACT

Introduction. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cell dysfunction has been documented in various autoimmune disorders, but not in antiphospholipid syndrome (APS) up to date. **Methods.** In this cross-sectional study, we aim to investigate

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells, CD3⁺CD19⁻ T cells and CD3⁻CD19⁺ B cells in patients with primary APS and healthy controls. Cell subtypes were immunophenotyped using specific monoclonal antibodies (anti-CD3 CY5, anti-CD4 FITC, anti-CD25, anti-Foxp3, anti-CD19 PE) and flow cytometry. **Results.** Twenty patients with APS and 20 age- and sex-matched controls were studied. The percentage of total lymphocytes, activated Th cells (CD4⁺CD25⁺), Treg cells and CD3⁻CD19⁺ B cells were found significantly lower in APS patients as compared to controls (all $p < 0.05$). **Conclusion.** A dysfunction in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells may represent one of the mechanisms leading to autoimmunity in APS patients. The decreased number of CD3⁻CD19⁺ B cells of APS patients warrants further elucidation.

Key words: antiphospholipid syndrome, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells, CD3⁻CD19⁺ B cells, autoimmunity.

1.Introduction

The antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune thrombophilia of young adults. Antiphospholipid (aPL) antibodies may generate thrombosis by activating platelet and endothelial cells, inhibiting natural anticoagulants, and triggering the complement system (1). Also, aPL antibodies can stimulate tissue factor expression by monocytes and endothelial cells (2). The precise mechanisms leading to hyperproduction of pathogenic aPL antibodies in APS patients remain obscure, nevertheless.

Natural, thymus-derived CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells are key lymphocytes involved in the maintenance of immunologic self-tolerance and prevention of autoimmunity (3). Natural Tregs can inhibit effector T cells and antigen-presenting cells via cell-contact-dependent suppression, by the release of granzyme/perforin or immunosuppressive cytokines such as IL-10 and IL-35 (4).

The transcription factor Foxp3 (Forkhead box P3) has been characterized as a master regulator of Treg development and function (5), and it has expanded the interest of studying Tregs in several autoimmune disorders (6). Knowingly, germ-line mutations of the Foxp3 gene are related to a multiorganic autoimmune disease, the IPEX syndrome (7). Treg cells, in fact, comprise a heterogeneous population with diverse phenotypes, including the IL-10 producing Tr1 subset induced in the periphery (8).

Recent research has demonstrated quantitative and/or functional defect of Treg cells in a variety of autoimmune rheumatic disorders (9). The potential role of Treg cells

in the control of aPL immune response of APS patients has not been explored so far. In this study, we originally quantified CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in patients with primary APS in comparison to healthy controls.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

This cross-sectional study included patients with primary APS from the Outpatient Lupus Clinic. Clinical and laboratory diagnosis of primary APS were based on classical Sidney criteria of 2006 (10). The exclusion criteria were as follows: 1) age lower than 16-year-old; 2) infective endocarditis or other current infections; 3) diabetes mellitus; 4) neoplasms (current or past); 5) infection by human immunodeficiency virus or *Treponema pallidum*. The following variables were evaluated in APS patients: age, sex; disease duration, and main clinical manifestations.

The control group comprised healthy individuals aged more than 16 years-old, matched by age and sex, and with no APS, connective tissue disorders, neoplasms and current infections.

Clinical and demographic data were obtained from a chart review and interview with patients or family after informed consent. The study was approved by the local ethics committee.

2.2. Cell separation

Twenty milliliters of peripheral blood were collected between 7:00 and 10:00 am, and stored in tubes with EDTA prior to analyses. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by gradient of density with Ficoll-Paque™ PLUS (Sigma, St Louis, MO) after centrifugation during 35 minutes on 400 g. After centrifugation (10 minutes at 200 g), the interface containing PBMC were collected and washed with PBS. Following separation, cells were re-suspended in RPMI (supplemented with gentamicin 0.5%, hepes 1%, bovine fetal serum 10%) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO); cell counting in microscopy (100 x) was adjusted to obtain 1.10^6 cells per sample to Treg cells analysis and 2.10^5 to B cells. The viability of cells was assessed with trypan blue (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

2.3. Cell immunophenotyping

Lymphocyte subpopulations were identified by multicolor flow cytometry. PBMC were washed with cytometry buffer (PBS containing FCS and 0.01% sodium azide) and treated with Fc blocking solution during 20 minutes in the dark, in order to prevent binding of unspecific antibodies. Cells were thereafter marked with combination of the following monoclonal antibodies (2 μ L): anti-CD19 PE for B cells, anti-CD3 CY5 for T cells; anti-CD4 FITC and anti-CD25 APC for Treg cells (Biosciences – San Jose, CA, EUA). To isolate Treg cells, intracellular identification of FoxP3 was obtained by using 20 μ L of an anti-FoxP3 PE antibody following instructions of the manufacturer (BD Biosciences). Cells were therefore washed, re-suspended and analysed by FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter). A minimum of 20,000 events were identified by

size (FSC) and granularity (SSC) and acquired by a flow cytometer FACS Canto II (BD Biosciences), being values determined by the software FACSDiva v5.0.2 and analysed by the software FlowJo (TreeStar US, Ashland, OR). Fluorescence was evaluated using as controls monoclonal antibodies with isotype and fluorochrome correspondence. In all experiments, control IgG antibodies were included (11).

2.4. Statistical analysis

Quantitative statistical analysis was performed using SPSS 17.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The significance level was set at $\alpha = 0.05$ (two-tailed). The results were shown as means and standard deviation or by absolute and relative frequencies. The statistical analysis included Student's t test and the Mann-Whitney test for the continuous variables, and chi-square or Fisher's exact test for categorical variables. Analysis of covariance (ANCOVA) was performed to assess relationships between variables.

3.Results

Twenty patients with APS and 20 healthy controls were included in the study. The mean age of APS patients was 47.5 years, and 17 out of the 20 patients (85%) were females. Mean duration of disease was 10.1 years. Moderate or high levels of anticardiolipin (aCL) antibodies were detected in 19 patients (95%), whereas the lupus anticoagulant was present in 5 patients (25%). As to clinical features, deep vein

thrombosis (DVT) was seen in 15 patients (75%), while fetal losses occurred in 8 patients (40%). Stroke was diagnosed in 6 cases (30%), and miscarriages in 3 patients (15%). Optic neuropathy and myocardial infarction were present in 2 cases (10%) and 1 case (5%), respectively. Fifteen patients (75%) were anticoagulated, and the remaining were on low-dose aspirin.

Table 1 compares demographic aspects and lymphocyte subsets of APS patients and controls. Both groups were homogenous regarding age and gender. The mean percentage of total lymphocytes, CD4⁺CD25⁺ activated T cells, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and CD3⁻CD19⁺ B cells were significantly lower in APS patients as compared to controls (all $p < 0.05$). The mean percentage of CD3⁺CD19⁻ T cells did not differ between groups. The APS patients had significantly lower Treg cells after controlling (ANCOVA) for percentage of lymphocytes ($F=34.85$, $p < 0.0001$) or activated T CD4⁺ cells ($F=28.12$, $p < 0.0001$). The FoxP3 expression in CD4⁺CD25⁺ cells, as estimated by mean fluorescence intensity (MFI), did not vary between APS patients and controls (2793.47 ± 1224.99 vs. 2417.25 ± 1915.01 , $p = 0.49$, respectively).

Figure 1 shows the distribution of total lymphocytes, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and CD3⁻CD19⁺ B in APS patients as compared to controls.

4. Discussion

The primary APS is an important cause of thrombotic events and pregnancy morbidity in young adults. aPL antibodies induce a proacogulant phenotype in the

endothelium and cellular proliferation in placental tissue (12). Particularly in obstetric APS, aPL-induced complement activation and release of pro-inflammatory cytokines are well recognized findings (13).

Nonetheless, the processes which trigger the synthesis of pathogenic aPL antibodies remain obscure. Natural $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg cells have a defined role in modulating the activity of self-reactive cells. Defects in Treg numbers and function probably contribute to the appearance of a number of autoimmune diseases (14). To our knowledge, this is the first study addressing $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg cells in primary APS.

Our survey of APS patients included predominantly middle-age females. APS patients and controls did not show significant differences as to age and sex. DVT was the predominant feature in our casuistic, and aCL was the most frequent autoantibody. In a previous report on primary APS, arterial thrombosis was slightly more prevalent than DVT, but the demographic and laboratory aspects were concordant with our data (15).

Even though our APS patients did not present a quantitative lymphopenia in strict terms, the mean percentage of total lymphocytes was lower than in controls; this finding could have resulted from a decreased number of circulating B cells, a defined feature of our APS survey (of note, the number of $CD3^+CD19^-$ T cells was similar in the two groups). The mechanisms leading to reduced percentages of circulating B cells in our APS patients are speculative, but might include autoantibodies to B lymphocytes or intrinsic defects of B cell subsets. Competent B cells are probably important to deflagrate Treg activity: in patients with common variable immunodeficiency, defective B cells seem to contribute to reduced Treg responses and autoimmune phenomena (16). In

experimental autoimmune encephalomyelitis, in turn, the activation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells occurs even in the absence of B lymphocytes (17). In APS, the interplay of B and Treg cells still needs further elucidation.

Here, we observed reduced percentages of circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in APS patients as compared to healthy controls. If confirmed, reduced Treg levels could be assumed as one of the immune mechanisms leading to pathogenic aPL responses in APS. In SLE, there is congruent data demonstrating decreased numbers of Treg cells in patients with active disease (18). An augmented activity of IL-17 producing T helper cells and a decreased Treg cell function have been postulated as an important pathogenic mechanism in SLE patients (19). Lower levels and dysfunction of circulating Treg cells were also demonstrated in patients with rheumatoid arthritis, being disease activity related to a greater reduction of Treg cells (20).

Our APS patients were quantified for Treg cells in a post-thrombotic phase, and this might be a limiting factor for conclusions. Further studies should investigate the biological functions of Treg cells during the thrombotic event. Also, we did not subgrouped APS patients by clinical features (obstetric, type of vascular event); it will be certainly of interest to look at circulating Treg cells in APS subsets in the future.

Recently, it has been shown that tolerogenic dendritic cells (tDC) inhibit APS derived autoreactive CD4⁺T cell responses to beta2-glycoprotein I by promoting Treg activity; thus, therapy with tDC might be an alternative for autoimmune diseases as APS by modulating Tregs (21). So far, therapy of APS patients has been fundamented rather more in anticoagulation than in immunomodulatory interventions. A direct approach shifting the balance to favor Tregs is being tried with autologous Treg cell therapy in type 1 diabetes, for instance (22). Confirmed a Treg dysfunction in APS patients, the

utilization of autologous Treg therapy in these patients might be promising. While a lot of questions regarding the pathogenesis of APS remain to define, it is possible that the progression to disease results from a breakdown in Treg-dependent peripheral self-tolerance.

In summary, this study demonstrated impaired numbers of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in patients with primary APS. Future studies shall address if reduced Treg levels are related to the abnormal aPL response typical of APS patients.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Palomo IG, Segovia FM, Alarcon ML, Fuentes BY, Pereira JG, Rojas A, et al. An insight into the pathophysiology of thrombosis in antiphospholipid syndrome. Front. Biosci 2007;12: 3093-3103.
2. López-Pedrerera Ch, Buendía P, Aguirre MA, Velasco F, Cuadrado MJ. Antiphospholipid syndrome and tissue factor: a thrombotic couple. Lupus 2006;15:161-6.
3. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev 2006;212:8-27.
4. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. Semin Immunol 2011;23:424-30.
5. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Nat Immunol 2003;4:330-6.
6. Valencia X, Lipsky PE. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in autoimmune diseases. Nat Clin Pract Rheumatol 2007;3:619-26.
7. d'Hennezel E, Bin Dhuban K, Torgerson T, Piccirillo C. The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. J Med Genet 2012;49:291-302.
8. Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. Toxicol Pathol 2012;40:186-204.

9. Bernard F, Romano A, Granel B. Regulatory T cells and systemic autoimmune diseases: systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, primary Sjögren's syndrome. Rev Med Interne 2010;31:116-27.
10. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2006;4:295-306.
11. Moon HW, Kim BH, Park CM, Hur M, Yun YM, Kim SY, Lee MH. CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T-cells in hematologic diseases. Korean J Lab Med. 2011;31(4):231-7.
12. Willis R, Harris EN, Pierangeli SS. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. Semin Thromb Hemost 2012;38:305-21.
13. Meroni PL, Gerosa M, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO. Updating on the pathogenic mechanisms of the antiphospholipid antibodies-associated pregnancy loss. Clin Rev Allergy Immunol. 2008;34:332-7.
14. Loser K, Beissert S. Regulatory T cells: banned cells for decades. J Invest Dermatol. 2012;132(3 Pt 2):864-71.
15. Gómez-Puerta JA, Martín H, Amigo MC, Aguirre MA, Camps MT, Cuadrado MJ, et al. Long-term follow-up in 128 patients with primary antiphospholipid syndrome: do they develop lupus? Medicine (Baltimore). 2005;84:225-30.
16. Genre J, Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Câmara NO, Rizzo LV. Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: a link to autoimmunity? Clin Immunol. 2009;132:215-21
17. Hoehlig K, Shen P, Lampropoulou V, Roch T, Malissen B, O'Connor R, et al. Activation of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells proceeds normally in the absence of B cells during EAE. Eur J Immunol. 2012;42:1164-73.
18. Kuhn A, Beissert S, Krammer PH. CD4(+)CD25 (+) regulatory T cells in human lupus erythematosus. Arch Dermatol Res. 2009;301:71-81
19. Alunno A, Bartoloni E, Bistoni O, Nocentini G, Ronchetti S, Caterbi S, et al. Balance between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus: The Old and the New. Clin Dev Immunol 2012;2012:823085.
20. Chen RL, Tao Y, Qiu KW, Huang WH, Huang CH, Li J. Association of circulating Treg cells with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2012;32(6):886-9.
21. Torres-Aguilar H, Blank M, Kivity S, Misgav M, Luboshitz J, Pierangeli SS, et al. Tolerogenic dendritic cells inhibit antiphospholipid syndrome derived effector/memory CD4⁺ T cell response to β2GPI. Ann Rheum Dis. 2012;71:120-8.

22.Thompson JA, Perry D, Brusko TM. Autologous Regulatory T Cells for the Treatment of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2012 Jul 28. [Epub ahead of print]

Table 1. Demographic data and lymphocyte subsets in 20 patients with primary antiphospholipid syndrome (APS) and 20 healthy controls.

	Primary APS	Controls	P
Mean age (years \pm SD)	47.5 \pm 14.8	42.3 \pm 8.3	0.45*
Females	17 (85%)	17 (85%)	1.00*
Total lymphocytes (% \pm SD)	28.31 \pm 2.92	32.2 \pm 2.49	<0.0001**
CD3 ⁺ CD19 ⁻ T lymphocytes (% \pm SD)	75.01 \pm 7.83	75.97 \pm 6.64	0.68**
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T lymphocytes	1.32 \pm 0.92	1.97 \pm 0.82	<0.05**
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T lymphocytes (% \pm SD)	0.71 \pm 0.35	1.93 \pm 0.61	<0.0001**
CD3 ⁻ CD19 ⁺ B lymphocytes (% \pm SD)	5.43 \pm 2.64	9.39 \pm 2.47	<0.0001**

SD: standard deviation; *Chi-squared test; **Student t test

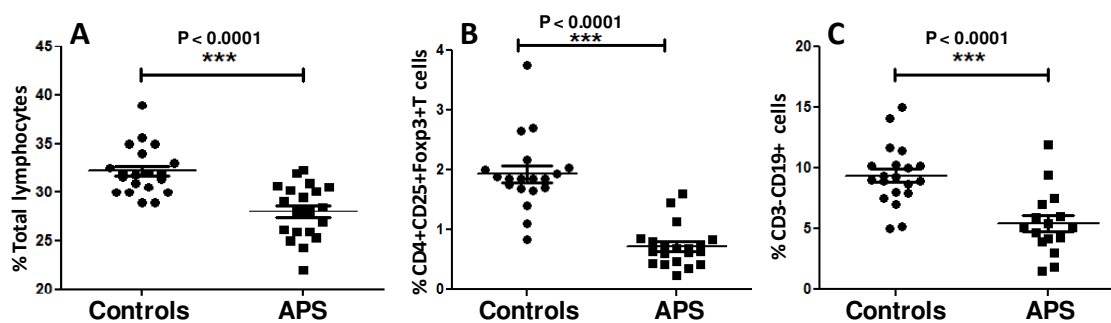


Figure 1. Graphical distribution of total lymphocytes (A), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells (B) and CD3⁻CD19⁺ B cells (C) in controls and patients with antiphospholipid syndrome (APS).

13 CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DE ARTIGO AO *IMMUNOLOGY LETTERS*

The screenshot displays the Elsevier Editorial System (EES) interface in a Windows Internet Explorer browser. The address bar shows the URL <http://ees.elsevier.com/imlet/default.asp>. The browser's search bar contains the Google logo and the text "Pesquisar". The page header includes the "immunology letters" logo, navigation links (home, main menu, submit paper, guide for authors, register, change details, log out), and user information (Username: esterdalbem@gmail.com, Role: Author). A message box titled "Author's Decision" contains the text: "Thank you for approving 'Patients with secondary antiphospholipid syndrome have decreased numbers of circulating CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells and CD3-CD19+ B lymphocytes'." Below the message are links for "View QC Results" and "Main Menu". The footer includes copyright information (Copyright © 2013 Elsevier B.V.) and a cookie notice. The Windows taskbar at the bottom shows the "Iniciar" button and several open applications, including "BOL Mail - Entrada (5...", "Elsevier Editorial Syst...", and "Documento1 - Micros...". The system clock shows the time as 18:47.

14 ARTIGO SUBMETIDO AO *IMMUNOLOGY LETTERS**Research article***Patients with secondary antiphospholipid syndrome have decreased numbers of circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and CD3⁻CD19⁺ B lymphocytes.**

Ester Rosári Raphaelli Dal Ben¹, Carine Hartmann do Prado¹, Talita Siara Almeida Baptista¹, Moisés Evandro Bauer¹, and Henrique Luiz Staub²

¹Laboratory of Immunosenescence, Institute of Biomedical Research, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

²Rheumatology Department, Saint Lucas Hospital of PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Henrique Luiz Staub. Rheumatology Department, Saint Lucas Hospital of PUCRS. Av. Ipiranga, 6690/220, Porto Alegre 90610-000, Brazil. Telephone: 0055(51)-3320-5057 Fax: 0055(51)-3328-8111 E.mail: reumatoacademico@gmail.com

ABSTRACT

Introduction. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cell depletion has been recently described in patients with primary antiphospholipid syndrome (APS), but the issue has not been addressed in secondary APS so far. **Objective.** To quantify total lymphocytes, Treg cells, CD3⁺CD19⁻ T cells and CD3⁻CD19⁺ B cells in patients with APS secondary to systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls. **Methods.** Cell subtypes were immunophenotyped using specific monoclonal antibodies (anti-CD3 CY5, anti-CD4 FITC, anti-CD25, anti-Foxp3, anti-CD19 PE) and flow cytometry. **Results.** Twenty-five patients with SLE-related APS (mean age 43.5 years, 96% females, mean SLEDAI 10±5.77) and 25 age- and sex-matched controls entered the study. Numbers of Treg and CD3⁻CD19⁺ B cells were found significantly lower in secondary APS patients than in controls (all p<0.05). Decreasing levels of circulating Treg cells correlated to higher scores of lupus activity (r=-0.75, p<0.0001). Number of circulating Treg cells did not significantly vary among users or nonusers of chloroquine, azathioprine and corticosteroids (p=0.90, p=0.76 and p=0.29, respectively). **Conclusion.** In this preliminary study, patients with active SLE and secondary APS showed depletion of Treg cells, and this might relate to autoimmunity. The decreased number of CD3⁻CD19⁺ B cells warrants further elucidation.

Key words: secondary antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus, Treg cells, CD3⁻CD19⁺ B cells

1. Introduction

Individuals with systemic lupus erythematosus (SLE) are more susceptible to thrombosis than the general population, and the antiphospholipid syndrome (APS) is a well-known risk factor for vascular obstruction in such patients. (1). Why patients with APS produce pathogenic aPL antibodies, it has been a matter of intense debate.

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells are a distinct thymically derived or inducible subset of T cells with unique abilities to suppress immune responses and to maintain immunological tolerance (2). The absence of Treg lymphocytes in knock-out or antibody depletion mouse models leads to systemic autoimmunity (3).

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cell dysfunction has been documented in a number of autoimmune disorders (4), but not in secondary (SLE-related) APS so far. We herein quantified total lymphocytes, Treg cells, CD3⁺CD19⁻ T cells and CD3⁻CD19⁺ B cells in patients with APS secondary to SLE and healthy controls.

2. Material and methods

This cross-sectional study included patients with SLE and history of secondary APS from our Outpatient Lupus Clinic. Clinical and laboratory diagnosis of SLE was based on the American College of Rheumatology 1997 criteria (5), while the Sidney 2006 criteria was utilized to diagnose APS (6). Lupus activity was assessed by the systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI (7).

The exclusion criteria were as follows: 1) age lower than 16-year-old; 2) infective endocarditis or other current infections; 3) diabetes mellitus; 4) neoplasms (current or past); 5) infection by human immunodeficiency virus or *Treponema pallidum*. The control

group comprised healthy individuals aged more than 16 years-old, matched by age and sex, and with no APS, connective tissue disorders, neoplasms and current infections. Clinical and demographic data were obtained from a chart review and interview with patients or family after informed consent. The study was approved by the local ethics committee.

Cell subtypes were immunophenotyped using the specific monoclonal antibodies anti-CD3 CY5, anti-CD4 FITC, anti-CD25, anti-Foxp3 and anti-CD19 PE ((Biosciences – San Jose, CA, USA) and identified by multicolor flow cytometry (8).

Quantitative statistical analysis was performed using SPSS 17.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The significance level was set at $\alpha = 0.05$ (two-tailed). The results were shown as means and standard deviation or by absolute and relative frequencies. The statistical analysis included Student's t test and the Mann-Whitney test for the continuous variables, and chi-square or Fisher's exact test for categorical variables. The Pearson test was utilized to correlate circulating Treg cells with the SLEDAI. Analysis of covariance (ANCOVA) was performed to evaluate relationships between variables.

3.Results

Twenty-five patients with secondary APS and 25 healthy controls entered the study. Middle-aged (mean age 43.5 years) females (96%) highly predominated. Mean duration of disease was 9.87 years. The average SLEDAI score was 10 ± 5.77 . Moderate or high levels of anticardiolipin (aCL) antibodies were detected in 21 patients (84%), whereas the lupus anticoagulant was present in 9 patients (36%). As to clinical features, deep vein thrombosis (DVT) was seen in 15 patients (60%), while fetal losses occurred in 6 patients (24%). Optic neuritis was seen in 4 cases (16%). Stroke and miscarriages were each diagnosed in 3 cases (12%). Fourteen patients (56%) were on oral anticoagulation with warfarin, and the remaining were on low-dose aspirin. Chloroquine,

azathioprine and corticosteroids were being utilized by 9 patients (36%), 5 patients (20%) and 16 patients (64%), respectively.

Table 1 compares demographic aspects and lymphocyte subsets of secondary APS patients and controls. Both groups were homogenous regarding age and gender. The mean number of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and CD3⁻CD19⁺ B cells were significantly lower in secondary APS patients as compared to controls ($p < 0.05$). The mean number of total lymphocytes, CD3⁺CD19⁻ T cells and CD4⁺CD25⁺ lymphocytes did not differ between groups. The secondary APS patients had significantly lower Treg cells after controlling (ANCOVA) for percentage of lymphocytes ($F = 28.50$, $p < 0.0001$). The FoxP3 expression in CD4⁺CD25⁺ cells, as estimated by mean fluorescence intensity (MFI), did not vary between APS patients and controls (2660.55 ± 1044.06 vs 2470.65 ± 1732.87 , $p = 0.67$, respectively).

Figure 1 shows the distribution of total lymphocytes, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells and CD3⁻CD19⁺ B in secondary APS patients as compared to controls. The Pearson test for correlation of circulating Treg cells with the SLEDAI is shown in figure 2. A significant negative correlation ($r = -0.75$, $p < 0.0001$) was noted, indicating that decreasing numbers of Treg lymphocytes were linked to increasing scores of lupus activity. Levels of circulating Treg cells did not significantly vary among users or nonusers of chloroquine, azathioprine and corticosteroids ($p = 0.90$, $p = 0.76$ and $p = 0.29$ in the Chi-squared test, respectively)

Discussion

A number of reports have accounted for depletion of Treg cells in patients with SLE (9-11). As far as we are aware, this study is the first addressing circulating Treg and B cells in patients with APS secondary to SLE. Our survey included predominantly middle-aged females. DVT was the predominant clinical feature, and aCL the most frequent autoantibody.

We have found a decreased number of circulating CD3⁻CD19⁺ B cells in our patients as compared to controls. The reasons for this B cell depletion are nebulous, but might include autoantibodies to B lymphocytes or intrinsic defects of B cell subsets. Of

note, competent B cells seem important to trigger Treg activity, as shown in patients with common variable immunodeficiency (12).

Reduced numbers of circulating CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells were seen in our APS patients as compared to controls. Of interest, decreasing levels of circulating Treg cells correlated with higher scores of disease activity. Reduced levels of Treg cells have been associated with active SLE (13,14), but other reports (15,16) questioned this finding. In our study, Treg depletion could be connected either to current SLE activity or previous APS, and this is hardly distinguishable. Worthy of note, Treg decrease did not appear to relate to chloroquine, azathioprine or steroid intake.

Our group recently reported low levels of circulating Treg and also of CD3⁻CD19⁺ B cells in patients with primary APS (17). These data may imply that depletion of both cell subsets is uniform in APS populations, but this is only hypothetical. If confirmed, Treg depletion may comprise one of the immune mechanism leading to pathogenic aPL responses in primary or secondary APS.

Our APS patients were quantified for Treg cells in a post-thrombotic phase, and this is a limitation of our study. Newer studies should investigate the biological function of Treg cells during the thrombotic event and longitudinally. Given the small sample, we could not subgroup APS patients by clinical features (obstetric, type of vascular event).

Recently, it has been reported that peripheral blood mononuclear cells from healthy donors when incubated with aPL antibodies show a significant decrease in Treg frequencies and a Th17 upregulation (18). Also of interest, tolerogenic dendritic cells (tDC) inhibited APS derived autoreactive CD4⁺T cell responses to β 2-glycoprotein I by promoting Treg activity (19).

To date, APS therapy has been based rather more on anticoagulation than in immunomodulatory interventions. A direct approach shifting the balance to favor Tregs is being tried with autologous Treg cell therapy in type 1 diabetes (20), and such intervention might be also promising in APS. While many questions concerning the pathogenesis of APS remain undefined, it is possible that the progression to disease results from a breakdown in Treg-dependent peripheral self-tolerance.

In summary, this preliminary study demonstrated impaired numbers of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in patients with APS secondary to SLE. Future studies

shall address if reduced Treg levels are related to the abnormal aPL response of APS patients. The reduction of CD3⁻CD19⁺ B cells seen in these patients, potentially linked to Treg dysfunction, also warrants clarification.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Burgos PL, Alarcón GS. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: risk and protection. Expert Rev Cardiovasc Ther 2009; 7:1541-9.
2. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. Nat Immunol 2008; 9:239-44.
3. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev 2006; 212:8–27.
4. Bernard F, Romano A, Granel B. Regulatory T cells and systemic autoimmune diseases: systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, primary Sjögren's syndrome. Rev Med Interne 2010; 31:116-27.
5. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40:1725.
6. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2006; 4:295-306.
7. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee of Prognosis Studies in SLE. Arthritis Rheum 1992; 35:630-40.

8. Moon HW, Kim BH, Park CM, Hur M, Yun YM, Kim SY, Lee MH. CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T-cells in hematologic diseases. Korean J Lab Med 2011; 31:231-7.
9. Fathy A, Mohamed RW, Tawfik GA, Omar AS. Diminished CD4+CD25+ T-lymphocytes in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. Egypt J Immunol 2005; 12:25-31.
10. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu JL, et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2006; 64:553-4.
11. Barreto M, Ferreira RC, Lourenco L, Moraes-Fontes MF, Santos E, Alves M, et al. Low frequency of CD4+CD25+ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGFbeta gene variants. BMC Immunol 2009; 10:5.
12. Genre J, Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Câmara NO, Rizzo LV. Reduced frequency of CD4(+)CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with common variable immunodeficiency: a link to autoimmunity? Clin Immunol 2009; 132:215-21.
13. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol 2008; 8:523-32.
14. 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; 175:8392-400.
15. Yates J, Whittington A, Mitchell P, Lechler RI, Lightstone L, Lombardi G. Natural regulatory T cells: number and function are normal in the majority of patients with lupus nephritis. Clin Exp Immunol 2008; 153:44-55.
16. Zhang B, Zhang X, Tang FL, L.P. Z, 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; 67:1037-40.

17. Dal Ben ERR, do Prado CH, Baptista TSA, Bauer ME, Staub HL. Decreased levels of circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with primary antiphospholipid syndrome. J Clin Immunol (In Press).

18. Xiao J, Zhu F, Liu X, Xiong J. Th1/Th2/Th17/Treg expression in cultured PBMCs with antiphospholipid antibodies. Mol Med Report 2012; 6:1035-9.

19. Torres-Aguilar H, Blank M, Kivity S, Misgav M, Luboshitz J, Pierangeli SS, et al. Tolerogenic dendritic cells inhibit antiphospholipid syndrome derived effector/memory CD4+ T cell response to β 2GPI. Ann Rheum Dis 2012; 71:120-8.

20. Thompson JA, Perry D, Brusko TM. Autologous regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes. Curr Diab Rep 2012 Jul 28. [Epub ahead of print]

Table 1. Demographic data and lymphocyte subsets in 25 patients with secondary antiphospholipid syndrome (APS) and 25 healthy controls.

	Secondary APS (n=25)		Controls (n=25)		P
Mean Age (years \pm SD)	43.5 \pm 12.84		43.80 \pm 8,45		0.93*
Females	24 (96%)		24 (96%)		1.00*
Total Lymphocytes	29.42 \pm 4.57%	2227.86 \pm 528.83 cells/ μ L	32.2 \pm 2.49%	2523.60 \pm 528.83 cells/ μ L	0.131**
CD3 ⁺ CD19 ⁻ T lymphocytes	73.72 \pm 8.34%	1522.52 \pm 527.20 cells/ μ L	73.64 \pm 7.70%	858.38 \pm 194.32 cells/ μ L	0,100**
CD4+CD25+ T lymphocytes	1.28 \pm 0.89%	20.50 \pm 9.35 cells/ μ L	1.81 \pm 0.80%	45.68 \pm 20.19 cells/ μ L	0,81**
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T lymphocytes	0.74 \pm 0.34%	21.61 \pm 12.70 cells/ μ L	1.83 \pm 0.77%	46.18 \pm 19.43 cells/ μ L	<0.0001**
CD3 ⁻ CD19 ⁺ B lymphocytes	5.71 \pm 2.66 %	136.34 \pm 92.68 cells/ μ L	9.25 \pm 3.00%	233.43 \pm 75.71 cells/ μ L	0.006**

SD: standard deviation; *Chi-squared test; **Student t test

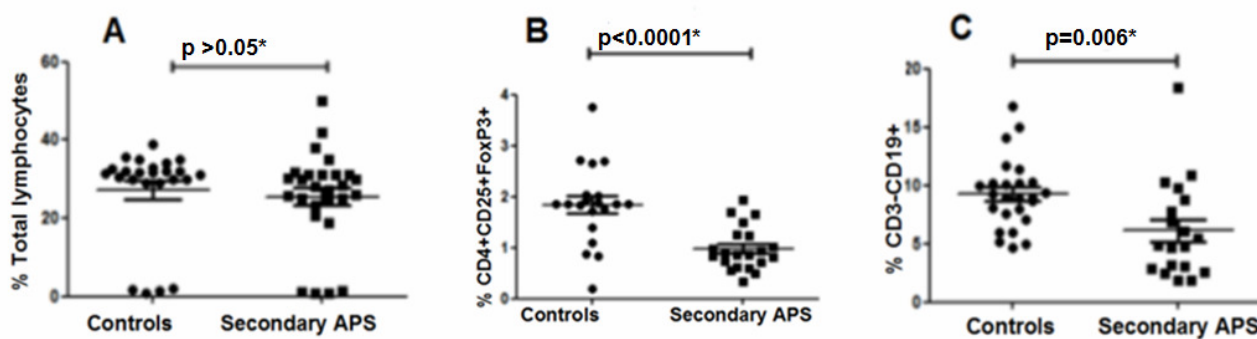


Figure 1. Graphical distribution of total lymphocytes (A), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells (B) and CD3⁻CD19⁺ B cells (C) in controls and patients with secondary antiphospholipid syndrome (APS).

*Student t test

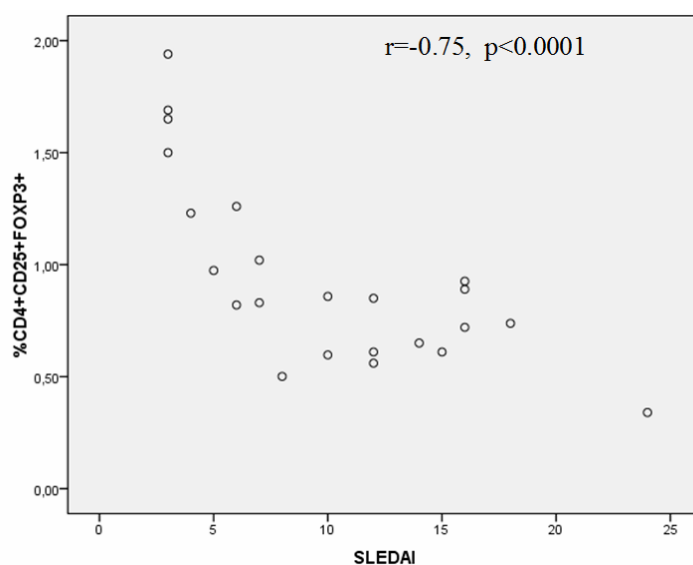


Figure 2. Pearson correlation of circulating Treg cells with lupus activity assessed by the systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI).

15 APÊNDICE

15.1 Termo de Aprovação do Comitê Científico



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Of. 348/10-PG

Porto Alegre, 04 de outubro de 2010.

A Pós-Graduanda
Ester Rosari Raphaelli Dal Ben
N/Faculdade

Prezada Pós-Graduanda:

Comunicamos que a proposta de tese intitulada "**Perfil de células T CD4 CD25 Foxp3 e células B CD19 em pacientes com síndrome antifosfolipídica primária e secundária**" foi **aprovada** pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

A mesma deverá ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa, através do setor de **Pesquisas e Estágios**, 2º andar do Hospital São Lucas/PUCRS. Após aprovação do CEP entregar cópia na secretaria do Programa. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Magda Lahorgue Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

C/c: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - 3º andar - CEP 90610-000
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3318 - Fax (51) 3320-3316
E-mail: medicina-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/famed/pos

15.2 Termo de Aprovação do Comitê de Ética



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-486/11

Porto Alegre, 25 de março de 2011.

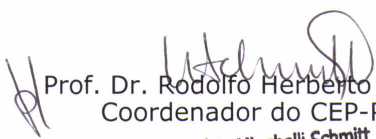
Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/05310 intitulado **"Perfil de Células T CD4 CD25 Foxp3 e células B CD19 em pacientes com síndrome antifosfolípídica primária e secundária (SAF)"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS
Profª Dr. Virginia Minghelli Schmitt
Coordenadora Substituta
Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
CEP - PUCRS

Ilmo. Sr.
Dr. Henrique Luiz Staub
HSL
Nesta Universidade

15.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO

Perfil de células CD4 CD25 Foxp3 e células B CD19 em pacientes com síndrome antifosfolipídica primária e secundária (SAF)

Por que este estudo está sendo realizado?

O ambulatório de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS atende centenas de pacientes portadores de diversas doenças reumáticas, entre elas, a Síndrome antifosfolipídica (SAF).

Este estudo está sendo realizado com o objetivo de estabelecer uma relação entre a quantidade de um tipo de células, as células T reguladoras e as células B, envolvidas na defesa do nosso organismo. Esses dados servirão como dados adicionais para a compreensão da doença.

De que consta o estudo?

O estudo será feito pela análise do prontuário do paciente para verificar o estágio (nível da doença) e de exames de sangue em pacientes com Síndrome antifosfolipídica e pacientes saudáveis .

Quais as vantagens em participar deste estudo?

1. Contribuir para o avanço e progresso do conhecimento sobre a Síndrome antifosfolipídica;
2. A coleta dos dados será realizada durante consulta de rotina no ambulatório de Reumatologia, o que não implica em comparecimento adicional para participar da pesquisa.

Quais as desvantagens em participar deste estudo?

1. Tempo maior de permanência no ambulatório para coleta de dados.
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma).

Dados relativos à proteção do paciente?

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados os dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma;
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar;
- C. A decisão de não participar não irá interferir no acompanhamento e tratamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência e nem na internação do Hospital São Lucas da PUCRS;
- D. O paciente é livre para desistir do estudo em qualquer momento, sem necessidade de fornecer justificativa.

Compreensão e Autorização.

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, autorizo a revisão do prontuário e coleta de sangue para doação à pesquisa e armazenamento pelo Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

Caso tiver dúvidas sobre este estudo, posso chamar Dr. Henrique Staub ou Ester Rosári R. Dal Ben nos telefones abaixo citados para qualquer pergunta sobre meus direitos como participante deste estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Paciente: _____ Registro: _____
Assinatura: _____

Pesquisador: Ester Rosári Raphaelli Dal Ben

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 2012.

Pesquisadores responsáveis:

Dr Henrique Luiz Staub – Tel(51) 3339-1622 ou (51) 3320-3000 – Ramal: 2368

Farm. Bioq. Ester Rosári Raphaelli Dal Ben – Tel : (51) 3656-1260

Comitê de Ética e Pesquisa – Tel (51) 3320-3345

15.4 Questionário aplicado aos controles

FICHA DE PACIENTES CONTROLES

Nome:

Sexo : M F

Idade: anos

Peso: Altura:..... I.M.C.:.....

Doenças reumáticas : S N Doenças autoimunes (outras): S N Diabetes : S N Hipertensão : S N Aterosclerose: S N Neoplasia : S N Infecções recentes: S N Quando?.....Medicação de uso crônico : S N Qual (ais)?.....Fator antinuclear : P N Título:.....

F = feminino

M = masculino

S = sim

P = positivo

N = não, negativo

