

EVALUAREA STATUSULUI LIMFOCITELOR T REGLATOARE ÎNTR-UN LOT DE PACIENȚI CU SINDROM SJÖGREN PRIMAR

T regulatory cells status in primary Sjögren's Syndrome patients

Daniela Opriș¹, Alina Besliu², Leontina Banica², Ruxandra Ionescu¹, Cristiana Matache²

¹Clinica de Medicină Internă și Reumatologie, Spitalul Clinic „Sfânta Maria”,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

²Institutul Cantacuzino, București

Rezumat

Sindromul Sjögren (SS) este o exocrinopatie autoimună cronică asociată cu infiltrare limfocitară de grade variabile la nivelul organelor afectate, în special glande lacrimale și salivare. Exista până în prezent câteva ipoteze privind rolul jucat de limfocitele T reglatoare în etiopatogenia, progresia bolii și complicațiile din SS.

Obiective. Evaluarea statusului Treg la pacienții cu Sindrom Sjögren primar, dar și variația acestuia funcție de manifestările de boală și factorii de prognostic negativ.

Material și metodă. S-a efectuat un studiu prospectiv care a inclus 46 de pacienți cu Sindrom Sjögren primar (SS) internați în Clinica de Medicină Internă și Reumatologie a Spitalului „Sfânta Maria”, București, și 43 de donatori sănătoși (grupul de control). Înrolarea pacienților s-a făcut în mod consecutiv prezentării lor. Limfocitele T CD4+ din sângele periferic au fost izolate după centrifugarea în gradient de densitate pe Ficoll-Paque, iar fenotipul lor a fost studiat prin citometrie de flux (FACS) și PCR în timp real.

Rezultate. În cazul pacienților cu SS, procentul de celule Tregs este semnificativ mai redus, în timp ce nivelul de expresie a receptorului CD25 este semnificativ mai crescut pe celulele Tregs comparativ cu subiecții grupului de control. Atât procentele de celule TregsGTR+, dar în mod special nivelul de expresie pe celulele Tregs al receptorului GITR par a fi mai crescute la pacienții cu SS comparativ cu subiecții de control. De asemenea, pacienții evaluați Treg au avut caracteristic nivele reduse de Foxp3, expresie intracelulară crescută de CTLA-4 și expresie crescută de CD45RO. Atât procentul de celule Tregs, cât și nivelul de expresie al Foxp3 în celulele T CD4+ s-au corelat cu: afectarea sistemică, hipocomplementemia sau prezența autoanticorpilor anti-La.

Concluzii. Aceste rezultate sugerează că pacienții cu SS pot fi caracterizați printr-un procent redus de limfocite T reglatoare cu caracteristici particulare și relevanță clinică.

Cuvinte cheie: Sindrom Sjögren primar, limfocite T reglatoare, Foxp3

Abstract

Background. Primary Sjögren's syndrome (pSS) is an autoimmune exocrinopathy associated with lymphocytic infiltrates mainly affecting salivary and lacrimal glands. There are some hypothesis suggesting that peripheral regulatory T (Treg) cells could have a role in etiopathogeny, progression and complications in SS patients.

Objective. The objective of this study was to investigate the presence and role of Treg in patients with primary SS (pSS).

Methods. 46 consecutive pSS patients admitted to Sfânta Maria Clinical Hospital and 43 healthy donors were evaluated. CD4+ cells circulating in peripheral blood of patients with pSS were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque medium and their phenotype was studied by flow cytometry (FACS) and real-time PCR.

Results. When compared with control group, pSS Treg's level was statistically significant lower meanwhile expression of CD25 receptor was significantly higher on patient's Treg than on normal subjects. Also, procentual TregGITR+ were higher in pSS population. Evaluation of patient's Treg characteristics revealed low levels of Foxp3 and intracellular higher expression of CTLA-4 and CD45RO. We found a positive correlation between level of Tregs, expression of Foxp3 and systemic involvement, low levels of complement or anti La antibodies.

Conclusion. This data suggest that pSS patients are characterized by low levels of Tregs associated with particular characteristics and clinical relevance.

Keywords: Sjögren's syndrome, regulatory T cells, Foxp3

Adresă de corespondență:

Dr. Daniela Opriș, Spitalul Clinic „Sfânta Maria”, Blvd Ion Mihalache 37-39, Sector 1, București

E-mail: danaopris0103@yahoo.com

INTRODUCERE

Sindromul Sjögren este o exocrinopatie autoimună cronică asociată cu infiltrare limfocitară de grade variabile la nivelul organelor afectate, în special glande lacrimale și salivare. Deși în ultimii ani s-au făcut progrese importante în înțelegerea etiopatogeniei și a modului de progresie al acestuia, până în momentul de față există încă aspecte controversate. Studiul rolului jucat de populațiile de celule T periferice în dezvoltarea, menținerea și apariția complicațiilor Sindromului Sjögren ar putea fi util într-o mai bună explicare a etiopatogeniei bolii, a comorbidităților și consecutiv pentru ameliorarea opțiunilor de tratament.

Limfocitele T CD4+ recunosc antigene specifice asociate cu Ag HLA II. Sunt principalii controlori ai răspunsului imun la antigene proteice. În momentul de față se consideră că foarte multe boli autoimune se dezvoltă datorită ruperii toleranței imune la celulele CD4+ (1,2).

Limfocitele T CD4+ sunt împărțite în general în celule T helper convenționale și limfocite T reglatoare. Acestea din urmă sunt indispensabile pentru buna funcționare a sistemului imun. Absența lor duce la anarhie imună cu consecințe devastatoare pentru

organism. Limfocitele T helper controlează imunitatea adaptativă împotriva patogenilor și a neoplaziilor prin activarea celulelor imune efectoare (3,4).

Limfocitele T reglatoare (Treg) sunt definite ca și limfocite T CD4+ cu rolul de a supresa efectele potențial dăunătoare ale LTh. Rolurile identificate ale Treg până în acest moment cuprind: prevenirea apariției bolilor autoimune prin menținerea toleranței la self, supresia reacțiilor alergice, astmului, precum și în toleranța materno-fetală. Activarea limfocitelor T reglatoare este antigen-specifică, ceea ce implică faptul că rolurile supresoare ale Treg sunt antigen-dependente (1-11) (Fig. 1).

OBIECTIVE

S-a demonstrat că alterarea mecanismelor toleranței periferice joacă un rol important în autoimunitate. Deoarece celulele T reglatoare sunt mediatori esențiali ai procesului de toleranță (9-11), am propus investigarea acestor celule la pacienții cu SS. În condițiile în care este demonstrat rolul limfocitelor T reglatoare în supresia autoimunității (7-11), un obiectiv a fost evaluarea statusului Treg la pacienții cu Sindrom Sjögren primar. Lucrarea își propune să realizeze o comparație între pacienții cu SS și voluntari

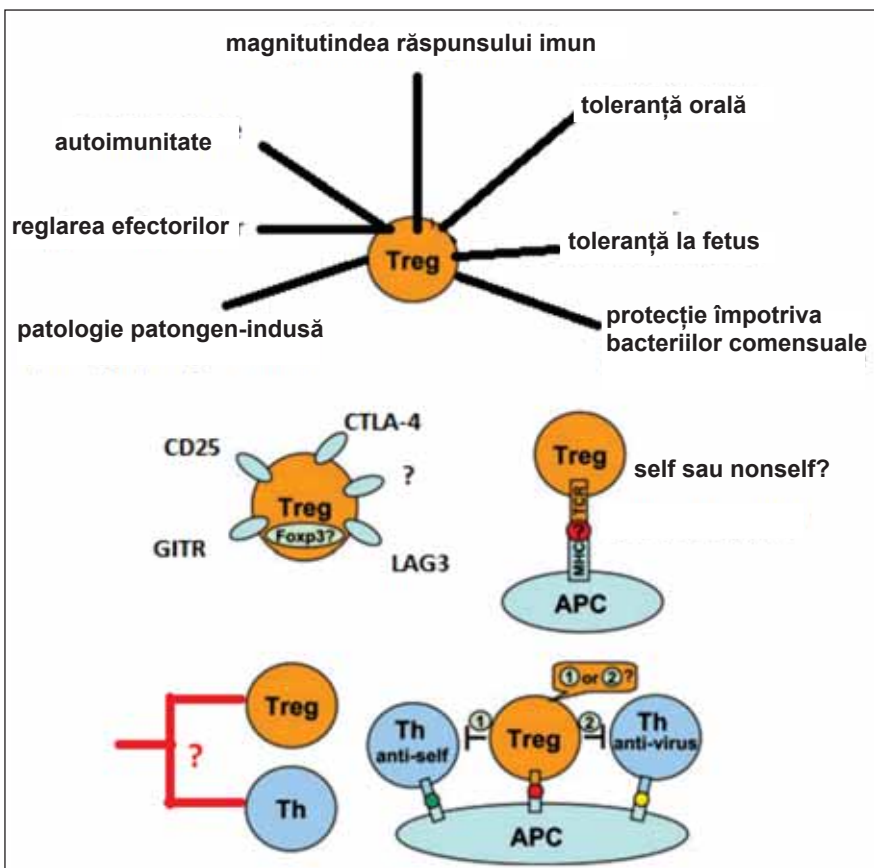


FIGURA 1. Rolurile limfocitelor T reglatoare

sănătoși și să analizeze variația nivelului Treg în cele două loturi de studiu, dar și variația acestuia în funcție de manifestările de boală și factorii de prognostic negativ.

MATERIALE ȘI METODE

Grupurile studiate includ 46 de pacienți cu Sindrom Sjögren primar (SS) și 43 de donatori sănătoși (grupul de control).

Caracterizarea demografică a pacienților cu SS este prezentată în Tabelul 1. Grupul de control a fost selectat astfel încât să fie concordant cu lotul de pacienți din punct de vedere al sexului și vârstei. Studiul a fost realizat în acord cu declarația de la Helsinki și aprobat de comitetele de etică locale (Spitalul Clinic „Sfânta Maria“ și INCDMI Cantacuzino).

TABELUL 1. *Principalele date demografice*

Număr de pacienți	46
Femei	46
Vârsta medie în ani (DS)	60,10 (16,01)
Durata medie a bolii	7,3 (4,1)
Lot control	43
Lot control femei	43
Vârsta medie în ani lot control (DS)	58,2 (14,7)

Izolarea celulelor

Celulele mononucleare periferice au fost izolate din sângele venos heparinizat al subiecților investigați după centrifugarea în gradient de densitate pe Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Din populațiile de celule mononucleare, prin tehnica de selecție negativă pe bile imunomagnetice (Dynabeads ClinExVivo, Dynal Biotech Invitrogen Co) au fost purificate celulele T CD4+. Prin citometrie în flux (FACS) s-a stabilit o puritate a preparatului de celule T CD4+ mai mare de 95%.

Marcarea celulelor pentru FACS

Celulele mononucleare periferice la o concentrație de 1×10^6 /ml în tampon fosfat salin (TFS) conținând ser fetal de vițel (2%) și azida de sodiu (0,1%) au fost incubate pentru 30 de minute la 37 de grade Celsius cu anticorpi monoclonali anti-CD25 marcați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) plus unul dintre anticorpii monoclonali anti-CD4, anti-GITR, anti-CD154 sau anti CD45RO marcați cu ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen și R&D Systems). Pentru marcajul intracelular și detecția intracelulară a CTLA-4, celulele au fost fixate cu 2% parafor-

maldehidă. Au fost mai întâi marcate pe suprafața cu anti-CD25-FITC și, în final, după permeabilizare cu saponina (0,3%) au fost marcate cu anti-CD154-PE. Absorbția nespecifică a fluorescenței a fost eliminată prin utilizarea unei probe de control negativ compusă din doi anticorpi monoclonali de aceeași specie și tip cu anticorpii din probele pozitive marcați cu FITC și PE. De precizat că acest tip de marcaj s-a realizat în scopul evaluării procentului de celule Tregs în populațiile de limfocite mononucleare periferice și pentru analiza expresiei unor receptori pe suprafața (CD25, GITR, CTLA-4, CD45RO) sau în interiorul celulelor Tregs (CTLA-4).

În scopul evaluării nivelului de fosforilare al Ser/Thr kinazei Akt, celulele mononucleare periferice au fost dublu marcate – extracelular și intracelular. Extracelular pentru receptorii CD4, CD8 sau CD19 exprimați de celulele T și respectiv B, utilizând anticorpi monoclonali anti-CD4, anti-CD8 sau anti-CD19 marcați cu FITC (BD Pharmingen). Intracelular cu anticorpi monoclonali anti-Akt fosforilată la Ser 473 și respectiv cu anticorpi monoclonali anti-Akt fosforilată la Ser 308 (R&D Systems). Așa cum am arătat mai înainte, marcajul intracelular a presupus fixarea și permeabilizarea probelor. Corespunzător fiecărui subiect luat în studiu s-a realizat și o probă de control negativ.

Evaluarea datelor de FACS s-a realizat utilizând software-ul gratuit WinMDI.2.7.

PCR în timp real

ARN total a fost izolat din celulele T CD4+ purificate folosind un kit comercial (Promega). Transcrierea inversă a ARN total a fost realizată cu primer specific folosind reactivi TaqMan pentru transcrierea inversă (Applied Biosystems) urmărind protocolul producătorului. Secvențele perechilor de primeri pentru Foxp3 și b-actina au fost anterior raportate. Secvența probei TaqMan pentru Foxp3 a fost: 5'-FAM-AGAACGCCATCCGCCACAA-TAMRA-3'. Nivelul de expresie al ARNm Foxp3 a fost măsurat prin PCR – în timp real utilizând kitul comercial TaqMan PCR Core (Applied Biosystems). Drept control endogen s-a utilizat gena pentru b-actină, iar nivelul de ARNm pentru b-actina s-a determinat tot prin PCR în timp real, folosind kitul comercial LightCycler DNAMaster SYBRGreen I (Roche Applied Science). Amplificarea s-a realizat cu sistemul AbiPrism7000 Sequence Detection (Applied Biosystems). Eficiențele de amplificare a genei țintă (Foxp3) și de referință (b-actina) au fost egale așa

cum a reieșit din experimentele individuale de validare. Pragul ciclului (Ct) a fost determinat folosind sistemul automat de setare. Expresia relativă a ARNm a fost cuantificată prin metoda 2^{-DDCt} .

ANALIZA STATISTICĂ

Testul Student (t-test) a fost utilizat pentru a identifica diferențele dintre grupul de pacienți cu Sindrom Sjögren și grupul de control sau dintre subgrupele de pacienți. Coeficientul de corelație Spearman a fost calculat pentru a identifica relația dintre parametrii determinați experimental și caracteristicile clinicopatologice ale pacienților cu SS. Au fost considerate semnificative rezultatele analizelor statistice pentru care probabilitatea (p) a fost $< 0,05$ și modulul coeficientului de corelație ($1/2r^{1/2}$) $> 0,5$.

REZULTATE

Principalele caracteristici clinice și paraclinice ale lotului de studiu sunt prezentate în tabelele următoare (Tabelul 2 și 3). Acestea au fost similare cu datele prezente în literatura de specialitate.

TABELUL 2. Principalele date clinice în lotul de studiu

Manifestare	Nr.	%
Xerostomie	39	84,78
Xeroftalmie	37	80,43
Manifestări extraglandulare	29	63,04
Vasculită	7	16,27
Afectare neurologică	4	8,69
Afectare articulară	22	47,82
Fenomen Raynaud	11	23,91
Limfom nonhodgkinian	1	2,17

TABELUL 3. Distribuția modificărilor paraclinice

	Nr.	%
Ac anti Ro	37	80,43
Ac anti La	18	39,13
Hipocomplementemie	15	32,60
FR	30	65,21

Analiza populațiilor de celule mononucleare periferice la pacienții cu SS

Celulele mononucleare periferice izolate de la pacienții cu SS și subiecții aparent sănătoși au fost

TABELUL 4. Analiza populațiilor de celule mononucleare periferice

Grup	Statistică	T CD4+ (%)	T CD8+ (%)	B CD19+ (%)	B CD19+CD72+ (%)
SS	medie	45,42	15,28	2,54	68,40
	DS	12,12	2,92	1,14	8,34
control	medie	40,22	23,47	3,09	79,04
	DS	5,96	6,13	1,56	7,78
SS versus. control	p (t-test)	0,167	0,006	0,481	0,042

analizate prin FACS. Rezultatele studiului sunt centralizate în Tabelul 4 și prezentate sub formă de histogramă în Fig. 2

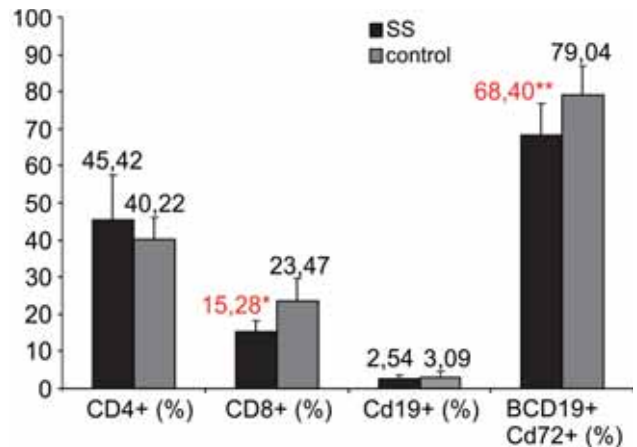


FIGURA 2. Analiza populațiilor de celule mononucleare periferice (histograma)

După cum se poate observa, grupul pacienților cu Sindrom Sjögren, spre deosebire de grupul de control, prezintă la nivel periferic procente semnificativ mai reduse de celule T CD8+ și B CD19+CD72+, aspect relevat și de raportul dintre procente de celule T CD4+ și T CD8+, raport semnificativ mai crescut în cazul pacienților cu SS (Fig. 3, Tabelul 5). Aceste rezultate evidențiază cel puțin alterarea mecanismelor de control negativ, cum ar fi cele care țin de supresia răspunsului imun prin celulele T CD8+ sau celule T CD8+ reglatoare, sau stabilirea pragului

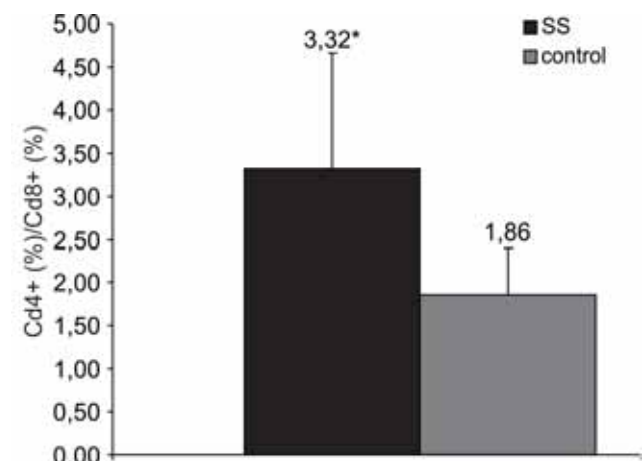


FIGURA 3. Raport CD4/CD8

de activare și inhibarea semnalelor activatorii de la nivelul celulelor B prin receptorii CD72.

TABELUL 5. Raportul CD4/CD8 comparat la pacienții cu SS/lot control

CD4+ (%) / CD8+ (%)	SS	control
medie	3,32*	1,86
DS	1,34	0,54
p (t-test)	0,010	

Deoarece receptorul pentru IL-2, CD25, este considerat un marker de activare al celulelor T (12-14), am considerat interesat de analizat procentul de celule T CD4+CD25+ ca și nivelul de expresie al acestui receptor [mediana intensității de fluorescență (MIF)].

Așa cum se poate observa din Tabelul 6 și Fig. 4, între pacienții cu SS și grupul de control nu există deosebiri statistice semnificative în ceea ce privește procentul de celule T CD4+CD25+. Totuși, se poate remarca nivelul diferit de expresie al receptorului CD25, mai crescut pe suprafața celulelor T CD4+ la pacienții cu SS. Această supraexpresie a receptorului sugerează abilitatea celulelor T CD4+ în SS de a fi mult mai ușor activate prin declanșarea celui de al treilea semnal de stimulare celulară (primul indus de antigen/autoantigen, al doilea de moleculele costimulatoare și al treilea de către citokine). Acest fapt poate determina în proliferarea și expansiunea clonală a celulelor T CD4+.

TABELUL 6. Evaluarea nivelului limfocitelor CD4+CD25+

Grup	Statistica	CD4+CD25+ (%)	CD4+CD25+ (MIF)
SS	medie	17,25	16,33
	DS	8,81	5,56
control	medie	16,91	13,94
	DS	7,63	0,93
SS vs control	p (t-test)	0,917	0,151

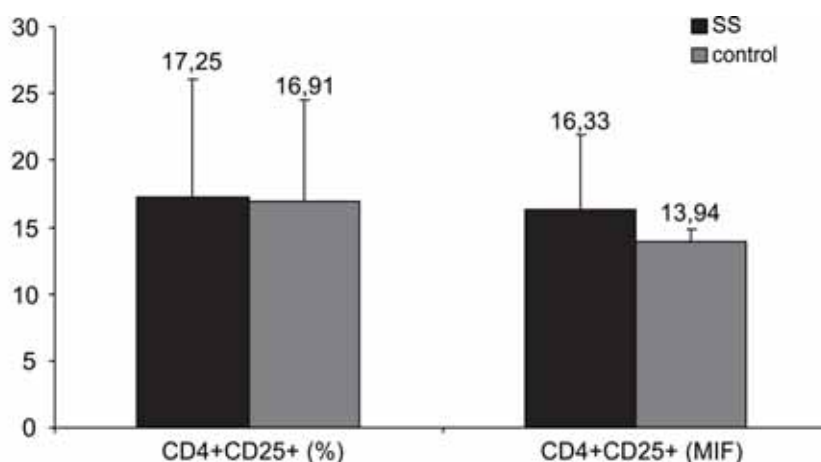


FIGURA 4. Evaluarea nivelului limfocitelor CD4+CD25+

Datele obținute de noi sunt concordante cu datele din literatura de specialitate (15-20) care semnalizează anterior creșterea expresiei receptorului CD25 (MIF) pe celulele T CD4+ ale pacienților cu SS. Cât privește nivelul de expresie al receptorului CD72 (MIF) pe celulele B CD19+ s-a sugerat (21) existența unei supraexpresii în SS, supraexpresie pe care noi nu am identificat-o în cazul pacienților cu SS investigați. Autorii observă totuși că prin stimularea *in vitro* a celulelor B CD19+CD72+ izolate de la pacienții cu SS expresia receptorului CD72 se diminuează. Pe baza acestor observații se poate presupune că în funcție de statusul de activare al celulelor B de la pacienții cu SS, receptorul CD72 este diferit exprimat. De asemenea, se știe că o dată cu proliferarea și diferențierea celulelor B în plasmocite secretoare de anticorpi, ambii receptori CD19 și CD72 devin subexprimați (22).

Evaluarea statusului de activare al celulelor T și B periferice la pacienții cu SS

Pe celule epiteliale izolate din glandele salivare ale pacienților cu SS s-a demonstrat existența unui nivel crescut de fosforilare a kinazei Akt dependent de stimularea celulară excesivă prin receptorul pentru EGF (23-25). Pe baza acestei observații, și a datelor obținute de noi am pus problema unei posibile dereglări a mecanismelor de semnalizare mediate de calea de PI3K/Akt/mTOR. Pentru început, în scopul verificării acestei ipoteze, am analizat prin citometrie de flux nivelul de fosforilare al kinazei Akt în celulele T CD4+, T CD8+ și B CD19+ izolate de la 4 pacienți cu SS. Deoarece fosforilarea a două reziduuri de aminoacizi (Ser 473 și Thr 308) este esențială pentru activitatea enzimei, am analizat atât procentele de celule care prezintă Akt fosforilat la cele două situsuri, cât și gradul de fosforilare al celor două situsuri (MIF). Tabelele 7 și 8 prezintă procentele de celule T

CD4+ și CD8+, ca și procentul de celule B CD19+ care exprimă kinaza Akt la unul dintre situsurile menționate. După cum se poate observa, procentul de celule T sau B cu kinaza Akt fosforilată la Thr 308 este mult mai mare decât al aceluiași tipuri celulare care prezintă kinaza Akt fosforilată la Ser 473. Așa cum ilustrează Fig. 4, activarea kinazei Akt are loc prin mecanisme secvențiale de activare dependente la rândul lor de activarea altor enzime a cascadei de semnalizare către nucleu. Datele din literatură (26,27) susțin ideea fosforilării Thr 308 de către o altă enzimă PDK1 activată odată cu producerea intracelulară a mesagerilor secundari ai fosfatidil inozitolului. Fosforilarea Akt la Ser 473 este un proces ulterior ce pare a fi mediat de complexul 2 care include ținta eucariotă a rapamicinei (mTORC2), în acest mod producându-se activarea deplină a kinazei Akt și translocarea sa de la membrană în citosol și nucleu, unde fosforilează multiple substraturi celulare implicate în reglarea multiplelor funcții celulare (28). Pe baza acestor considerente putem presupune că în cazul celor 4 pacienți cu SS celulele T și B prezintă un grad înalt de activare a kinazei PDK1, de aceea și procentul mai mare de celule care exprimă kinaza Akt fosforilată la Thr 308. Cu toate acestea mediana intensității de fluorescență pare a fi comparabilă atunci când se măsoară nivelul de fosforilare al celor două situsuri, raportul pAktThr308 (MIF)/pAktSer473 (MIF) fiind

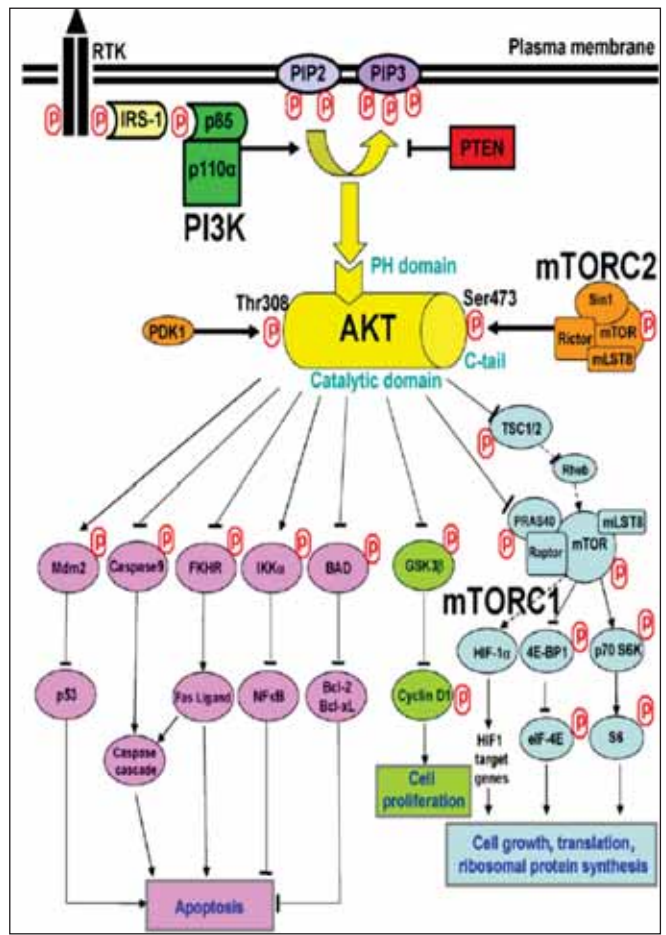


FIGURA 5. *Current Opinion in Pharmacology* 2008, 8:393-412 - Yap T.A., Garrett M.D., Walton M.I., Raynaud F., Bono J.S. and Workman P.

TABELUL 7

pacient	CD4 pAktSer473		CD4 pAktThr308		pAktThr308/ pAktSer473	pAktThr308/ pAktSer473
	%	MIF	%	MIF	%	MIF
SS 1	2,29	33,98	42,28	37,18	18,46	1,09
SS 2	15,75	23,29	69,03	29,43	4,38	1,26
SS 3	6,42	29,69	61,29	35,87	9,55	1,21
SS 4	6,6	29,69	58,6	35,55	8,88	1,20

TABELUL 8

pacient	CD8 pAktSer473		CD8 pAktThr308		pAktThr308/ pAktSer473	pAktThr308/ pAktSer473
	%	MIF	%	MIF	%	MIF
SS 1	3,49	38,89	16,86	33,98	4,83	0,87
SS 2	14,86	23,29	74,18	29,96	4,99	1,29
SS 3	6,13	42,55	49,14	32,20	8,02	0,76
SS 4	2,56	28,39	73,01	37,52	28,52	1,32

TABELUL 9

pacient	CD19 pAktSer473		CD19 pAktThr308		pAktThr308/ pAktSer473	pAktThr308/ pAktSer473
	%	MIF	%	MIF	%	MIF
SS 1	2,20	33,38	38,01	37,52	17,28	1,12
SS 2	3,67	22,07	76,18	30,51	20,76	1,38
SS 3	3,88	54,25	45,67	33,08	11,77	0,61
SS 4	2,13	33,68	21,63	31,06	10,15	0,92

aproape unitar. În acest context este de presupus că nivelul de exprimare al kinazei Akt în diferitele tipuri celulare este comparabil, în timp ce variabilitatea rapoartelor pAktThr308 (%)/pAktSer473 (%) sugerează stadii diferite de activare a kinazei Akt dependente atât de tipul celular (T CD4+, T CD8+, B CD19+), cât și de stadiul de activare al acestor celule.

Aceste prime rezultate încurajează studiile ulterioare, mai ales dacă se ține cont de rolul important jucat de calea PI3K/AKT/mTOR în limfogeneză (X)

Celulele T reglatoare și caracteristicile lor fenotipice în SS

Deoarece celulele T reglatoare sunt caracterizate printr-o expresie înaltă (high) a receptorului CD25 (29-31), într-o primă etapă am analizat prin FACS atât procentul de celule T reglatoare (Tregs, CD4 + CD25high), cât și nivelul de expresie al CD25 pe celulele T regs (Tabelul 10, Fig. 6).

TABELUL 10. Procentul de celule T reglatoare (Tregs, CD4 + CD25high) și nivelul de expresie al CD25 pe celulele T regs

Grup	Statistică	CD4+CD25high (%)	CD4+CD25high (MIF)
SS	medie	2,33	34,49
	DS	1,20	7,59
control	medie	4,79	23,85
	DS	1,20	4,90
SS vs control	p (t-test)	0,00002	0,0003

Analiza statistică a datelor a arătat că, în cazul pacienților cu SS, procentul de celule Tregs este semnificativ mai redus, în timp ce nivelul de expresie a receptorului CD25 este semnificativ mai crescut pe celulele Tregs, comparativ cu subiecții grupului de control.

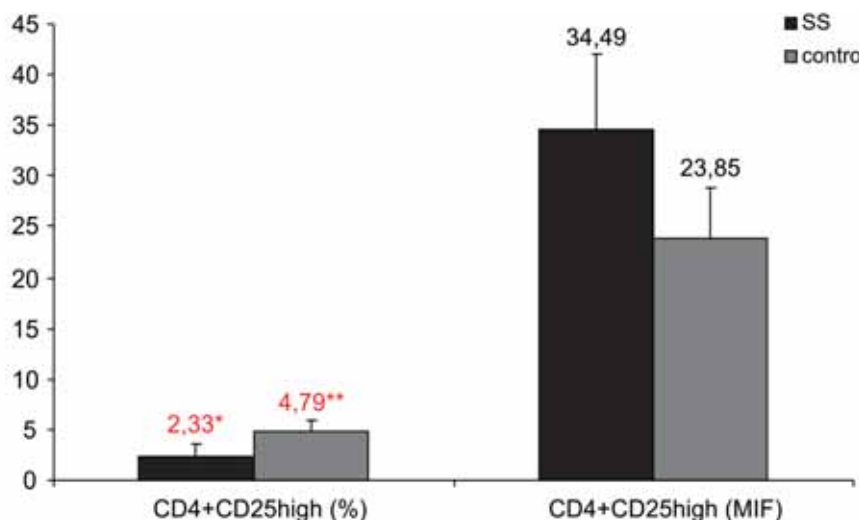


FIGURA 6. Procentul de celule T reglatoare (Tregs, CD4+CD25high) și nivelul de expresie al CD25 pe celulele Tregs

Așa cum am arătat mai înainte, celulele T odată activate exprimă gradual receptorul CD25. De aceea, CD25 nu poate fi considerat un marker de elecție pentru celulele Tregs. Mult mai important pentru identificare, dar și pentru caracterizarea funcțională a celulelor Tregs s-a dovedit a fi gena foxp3(32-34). Pe acest considerent, prin tehnica de PCR în timp real, am analizat în celulele T CD4+ ale pacienților cu SS și donatorilor sănătoși nivelul de expresie al produsului de transcripție al genei Foxp3, respectiv ARNm Foxp3 (Tabelul 11, Fig. 7).

TABELUL 11. Nivelul de expresie al Foxp3, respectiv ARNm Foxp3

Grup	Statistică	ARN Foxp3
SS	medie	0,71
	DS	0,45
control	medie	1,38
	DS	0,50
SS vs control	p (t-test)	0,023

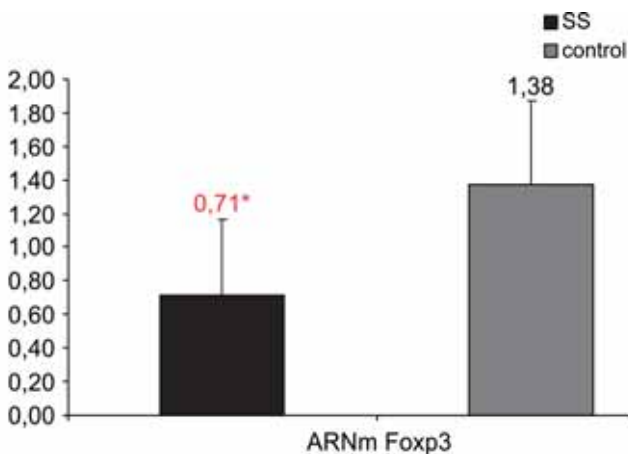


FIGURA 7

Această analiză confirmă rezultatele obținute prin FACS, sugerând pe de o parte că numărul de celule Tregs în SS este mai redus decât la subiecții de control, iar, pe de altă parte, expresia redusă a ARNm Foxp3 pune problema unei disfuncționalități a acestui tip celular. Aceasta deoarece funcția lor de supresie este dependentă de expresia Foxp3 (35).

Alți receptori importanți pentru activarea, memoria și proliferarea celulelor Tregs sunt: GITR, CD45RO și, mai ales, CTLA-4 (receptor exprimat atât extra, cât și intracelular) (36). De aceea, celulele T CD4 + CD25high au fost analizate și pentru expresia acestor receptori. Datele de FACS și rezultatele prelucrărilor statistice sunt prezentate în Tabelele 12-14 și Fig. 8-9.

După cum se poate observa (Tabelul 12, Fig. 10), atât procentele de celule TregsGITR+, dar în mod special nivelul de expresie pe celulele Tregs al receptorului GITR par a fi mai crescute la pacienții cu SS comparativ cu subiecții de control. Totuși, diferențele observate prin analizele de FACS nu sunt susținute și de analiza statistică ($p > 0,05$).

TABELUL 12

Grup	Statistică	CD25high GITR+ (%)	CD25high GITR+ (MIF)
SS	medie	5,45	264,17
	DS	6,30	485,89
control	medie	2,95	73,71
	DS	5,72	122,28
SS vs control	p (t-test)	0,370	0,311

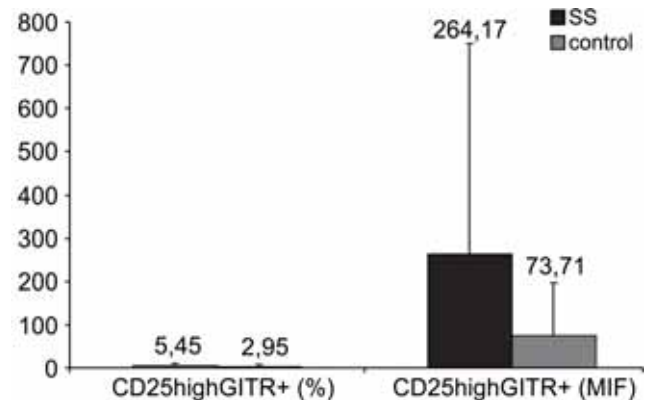


FIGURA 8

TABELUL 13

Grup	Statistică	CD25high CTLA-4+ (%)	CD25high CTLA-4+ (MIF)	CD25high CTLA-4i+ (%)	CD25high CTLA-4i+ (MIF)
SS	medie	2,59	71,47	68,96	67,67
	DS	3,25	109,78	21,59	91,12
control	medie	1,28	23,55	41,40	24,61
	DS	1,39	27,38	10,08	7,49
SS vs control	p (t-test)	0,220	0,167	0,001	0,131

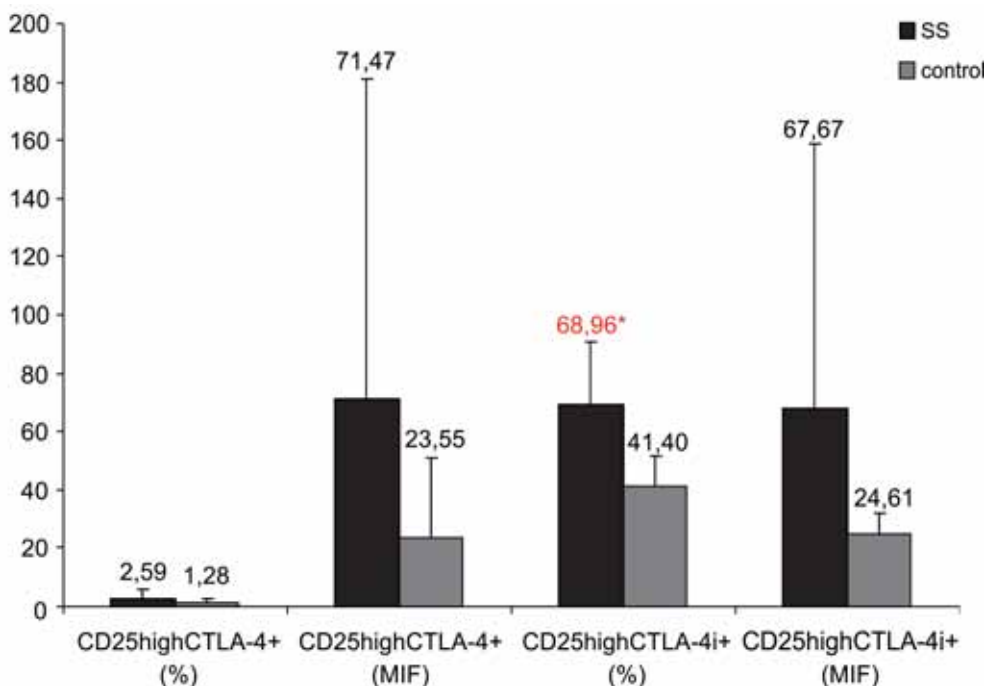


FIGURA 9

Cât privește expresia extracelulară sau intracelulară a receptorului CTLA-4, dar și procentul de celule TregsCTLA-4+ (extracelular sau intracelular), de asemenea, se remarcă o predominanță în cazul pacienților cu SS în raport cu subiecții de control. Totuși, diferențele au semnificație statistică numai sub aspectul procentului de celule Tregs care exprimă intracelular CTLA-4 (Tabelul 13, Fig. 11). Această subpopulație celulară este semnificativ mai numeroasă în cazul pacienților cu SS.

Continua stimulare antigenică/autoantigenică la care sunt expuse celulele Tregs în cazul pacienților cu SS face ca aceste celule să fie nu numai numeric mai multe, dar să și exprime un nivel mai mare de CD45RO comparativ cu subiecții de control (Tabelul 14, Fig. 10).

TABELUL 14

Grup	Statistică	CD25high CD45RO+ (%)	CD25high CD45RO+ (MIF)
SS	medie	90,97	207,29
	DS	4,08	175,59
control	medie	76,90	79,07
	DS	7,92	34,71
SS vs control	p (t-test)	0,00005	0,023

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Pentru a evalua posibila implicare a celulelor Tregs naturale în patologia SS, au fost utilizate două metode statistice de investigare.

1) Pentru fiecare caracteristică clinicopatologică s-a acordat un scor arbitrar. Astfel au primit scorul 2 pacienții care prezentau: tumefacții parotidiene (PTD), afectare digestivă (DG), manifestări extraglandulare (EX), manifestări articulare (ART), fenomen Raynaud

(Ray), manifestări sistemice (Sy), analiza histochimică pozitivă (HIS), valori pozitive ale proteinei C reactive (PCR), consum de complement (C), titruri serice pozitive de autoanticorpi [anti-La, anti-Ro, anti-nucleari (ANA), factor reumatoid (FR)] ca și pacienți care au primit diverse tipuri de terapii [corticoterapie (CS), hidroxicloroquin (HQ), terapie complexă (Tcx) pentru care scorul s-a determinat prin însumarea scorurilor acordate pentru toate medicamentele administrate]. Pentru ceilalți markeri care caracterizează SS nu s-au putut realiza evaluări statistice deoarece din lotul de pacienți numai unul eventual doi pacienți prezentau acel marker. Odată atribuite aceste scoruri, folosind testul statistic Spearman s-au calculat coeficienții de corelație (r) și probabilitatea corespunzătoare (p) prin corelarea scorurilor corespunzătoare parametrilor clinici cu valorile parametrilor determinați experimental.

2) Un alt mod de analiză statistică s-a bazat pe subgruparea pacienților cu SS (pacienți care prezentau pozitiv un anume parametru clinic și pacienți care nu se caracterizau prin prezența aceluși parametru) și analiza diferențelor dintre subgrupele corespunzătoare sub aspectul valorilor parametrilor determinați experimental [testul de diferență Student (t-test)].

Această evaluare a condus la o serie de rezultate cu semnificație statistică prezentate în Tabelele 14 și 16. După cum se poate observa, atât procentul de celule Tregs, cât și nivelul de expresie al Foxp3 în celulele T CD4+ sunt în corelație directă cu: afectarea sistemică, hipocomplementemia sau prezența autoanticorpilor anti-La. Pentru aceste situații se poate presupune că celulele Tregs naturale, deși numeric relativ egale cu celulele subiecților de control, sunt

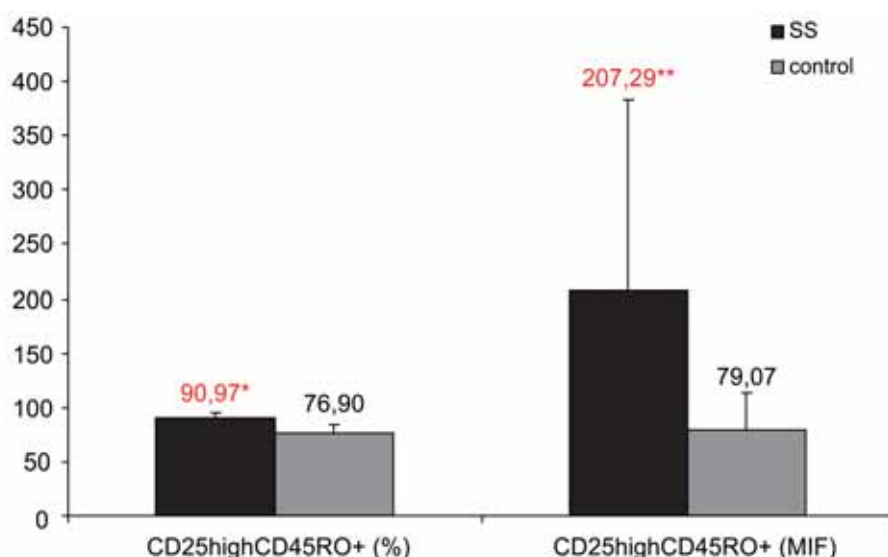


FIGURA 10

incapabile de a menține sub control mecanismele toleranței imune periferice. Deși nivelul de expresie al genei *foxp3* a fost relativ normal în cazul pacienților cu SS, totuși celulele Tregs par a fi incapabile de a induce supresia răspunsului imun. Această aparentă inadvertență poate fi explicată prin aceea că nivelul de ARNm *Foxp3* analizat în studiul nostru a fost evaluat la nivelul tuturor celulelor T CD4+ și nu numai la nivelul celulelor Tregs. Cum în aceste manifestări clinice celulele T CD4+ sunt cronic activate, este posibil ca nivelul aparent normal de ARNm

Foxp3 (exprimat și de celulele T CD4+ activate) să fie consecința activării celulare.

În cazul pacienților SS care prezintă titruri serice pozitive de autoanticorpi anti-Ro se remarcă, de asemenea, existența unei corelații directe cu procentele de celule Tregs. În cazul acestor pacienți este posibil ca nivelul de *foxp3* în celulele Tregs să fie redus și funcția de supresie a celulelor Tregs să fie în consecință alterată. O altă explicație posibilă pentru corelațiile directe între unii markeri clinici și celulele Tregs ar putea fi și expresia anormală a unor receptori

TABELUL 15

Parametri corelați	Statistică	Tregs %	ARNm Foxp3	CD25high CD45RO+MIF	CD25high CTLA-4i+%
Sy	r	0,676	0,791		
	p	0,011	0,034		
VSH	r		0,818		
	p		0,024		
C	r	0,802	0,791		
	p	0,001	0,034		
LA	r	0,845	0,791		0,563
	p	0,000	0,034		0,057
RO	r	0,634			
	p	0,020			
HIS	r			0,579	
	p			0,038	

TABELUL 16. Corelații clinico-paraclinice

Subgrupe comparate	Statistică	Tregs %	ARNm Foxp3	CD25high CD45RO+MFI	CD25high CTLA-4i+ %
Sy +	medie	3,28	1,32		
	DS	1,02	0,13		
Sy -	medie	1,74	0,47		
	DS	0,92	0,21		
Sy+ vs Sy-	p	0,025	0,007		
VSH > 30 (+)	medie		1,12		
	DS		0,36		
VSH < 30 (-)	medie		0,41		
	DS		0,18		
VSH+ vs VSH-	p		0,058		
C ↓	medie	3,66	1,32		
	DS	0,66	0,13		
C n/crescut	medie	1,74	0,47		
	DS	0,86	0,21		
C ↓ vs C -	p	0,003	0,007		
La +	medie	3,47	1,32		82,91
	DS	0,71	0,13		15,92
La -	medie	1,62	0,47		59,00
	DS	0,83	0,21		20,18
La+ vs La-	p	0,002	0,007		0,045
Ro +	medie	2,92			
	DS	0,96			
Ro -	medie	1,22			
	DS	1,01			
Ro+ vs Ro-	p	0,032			

celulari implicați în activarea și reglarea pragului de activare a celulelor Tregs, cum ar fi receptorii CD45RO și CTLA-4, așa cum pare să se întâmple în cazul pacienților cu autoanticorpi anti-La prezenți sau al celor cu afectare tisulară.

Faptul că procentul de celule Tregs, nivelul de expresie al ARNmFoxp3 în celulele T CD4+, nivelul de expresie al receptorului CD45RO ca și procentul de celule Tregs cu expresie intracelulară de CTLA-4 este diferit între subgrupe de pacienți cu afectare sistemică, cu markeri pozitivi de inflamație, autoanticorpi prezenți și subgrupele complementare sugerează potențialul de diagnostic și prognostic al acestor parametri. Nu putem exclude și ideea că în cazul acestor pacienți, procentele aparent normale de celule Tregs la nivel sistemic să fie, de fapt, în concordanță cu migrarea lor de la nivel tisular. De asemenea, nici rolul terapiei nu poate fi neglijat, dacă ținem cont de corelațiile directe cu tipul de terapie (Tabelul 16) sau de diferențele dintre subgrupele de pacienți care au primit un anumit tip de terapie și subgrupele complementare și procentele de celule Tregs, de celule TregsCTLA-4i+ sau nivelul de expresie al CTLA-4i în celulele Tregs.

TABELUL 17

Parametri corelați	Statistică	Tregs %	CD25high CTLA-4i+ %	CD25high CTLA-4i+ MIF
CS	r			0,676
	p			0,016
HQ	r	0,577		
	p	0,039		
Tcx	r		0,777	0,784
	p		0,003	0,003

TABELUL 18

Subgrupe comparate	Statistică	Tregs %	CD25high CTLA-4i+ %	CD25high CTLA-4i+ MIF
CS +	medie			120,01
	DS			107,91
CS -	medie			15,33
	DS			6,92
CS+ vs CS-	p			0,063
HQN +	medie	2,85		
	DS	1,28		
HQ -	medie	1,72		
	DS	0,83		
HQ + vs HQ-	p	0,084		
Tcx +	medie		84,34	121,00
	DS		12,20	106,77
Tcx -	medie		53,59	14,34
	DS		17,58	6,36
Tcx + vs Tcx -	p		0,007	0,058

Pe aceste considerente putem sublinia pe de o parte rolul pe care celulele Tregs naturale îl joacă în patogenia SS, iar pe de altă parte rolul terapiei convenționale în reglarea sau dereglarea funcției acestor celule. Desigur, studii suplimentare se cer în viitor pentru elucidarea nivelului de expresie al ARNm Foxp3 în celulele Tregs, dar și pentru evaluarea funcției de supresie a acestor celule în cazul pacienților cu SS.

Elemente celulare caracteristice unui pacient cu SS care a dezvoltat limfom

Unul dintre pacienții cu SS a prezentat evoluție spre limfom. Am urmărit identificarea unor elemente celulare și moleculare prin care acest pacient se deosebește de ceilalți pacienți cu SS, observând totodată decelarea unor factori cu potențial de prognostic pentru dezvoltarea limfomului.

Așa cum se poate observa din Fig. 11, în cazul pacientului cu limfom procentul de celule T CD4+ este mult mai redus în raport cu valoarea mediane pentru întreg grup de pacienți.

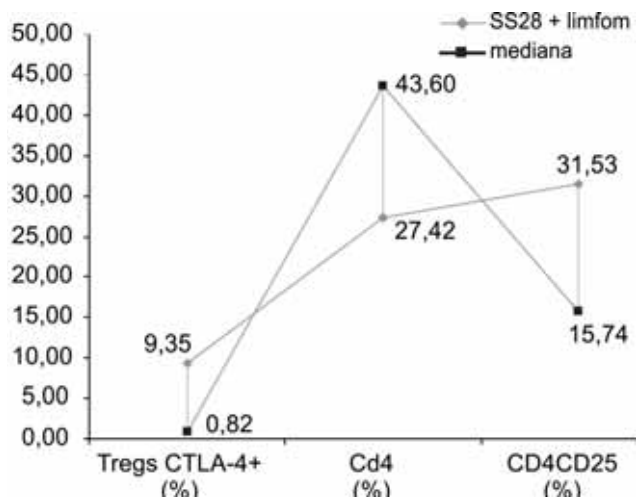


FIGURA 11. Nivelul celulelor T CD4+ la pacientul cu evoluție spre limfom

În ansamblu, aceste rezultate sugerează că pacienții cu SS pot fi caracterizați printr-un procent redus de limfocite T reglatoare care se caracterizează prin: nivele reduse de Foxp3, expresie intracelulară crescută de CTLA-4 și expresie crescută de CD45RO.

Mențiune

Această lucrare este efectuată în cadrul Programului Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane (POSDRU), finanțat din Fondul Social European și Guvernul României prin contractul nr. POSDRU/159/1.5/S/137390.

BIBLIOGRAFIE

1. Piccirillo C.A., Shevach E.M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+ CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001; 167:1137-40.
2. Green E.A., Gorelik L., McGregor C.M., Tran E.H., Flavell R.A. CD4+ CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cellsthrough TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10878-83.
3. Lim H.W., Hillsamer P., Banham A.H., Kim C.H. Cutting edge:direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175:4180-3.
4. Fields M.L., Hondowicz B.D., Metzgar M.H. et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit the maturation but not the initiation of an autoantibody response. *J Immunol* 2005; 175:4255-64.
5. Maloy K.J., Salaun L., Cahill R., Dougan G., Saunders N.J., Powrie F. CD4+ CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 197:111-9.
6. Schwartz R.H. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005; 6:327
7. Taams L.S., van Amelsfort J.M., Tiemessen M.M., Jacobs K.M., de Jong E.C., Akbar A.N., Bijlsma J.W., Lafeber F.P. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol* 2005; 66
8. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6:338
9. Wahl S.M., Wen J., Moutsopoulos N.M. The kiss of death: interrupted by NK-cell close encounters of another kind. *Trends Immunol* 2006; 27:161-164
10. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330-6.
11. Ghiringhelli F., Wan Y.Y., Flavell R.A. Identifying Foxp3-expressing suppressor Tcells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:5126-31.
12. Chatila T.A., Blaeser F., Ho N. et al. JM2, encoding a fork headrelated protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000; 106:R75-81.
13. Nicolas P., Agnes M., Azimzadeh, Tianshu Z., Nahzli D., Caroline M., Bao N., Xavier T., Guosheng Wu, Karine R., Jeremy H., Bernard M., Flora C., Emma A.L., Georges K., Jean-Paul S., Richard N.P., Gilles B., Bernard V. CTLA-4-dependent Immune Regulation by Selective CD28 blockade Promotes Regulatory T cells in Organ Transplantation *Sci Transl Med.* 2010 February 3; 2(17): 17ra10. doi:10.1126/scitranslmed.3000116.
14. Alegre M.L., Frauwirth K.A., Thompson C.B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat RevImmunol* 2001; 1:220-228.
15. Li X., Li X., Qian L., Wang G., Zhang H., Wang X., Chen K., Zhai Z., Li Q., Wang Y., Harris D.C. T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2007; 34:2438-2445
16. Kremer J.M., Westhovens R., Leon M., Di Giorgio E., Alten R., Steinfeld S., Russell A., Dougados M., Emery P., Nuamah I.F., Williams G.R., Becker J.C., Hagerty D.T., Moreland L.W. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4lg. *N Engl J Med* 2003; 349:1907-1915
17. Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Iwata M., Shimizu J., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10:1969-1980.
18. Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12:431-440.
19. Zheng Y., Manzotti C.N., Liu M., Burke F., Mead K.L., Sansom D.M. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172:2778-2784.
20. Waterhouse P., Penninger J.M., Timms E., Wakeham A., Shahinian A., Lee K.P., Thompson C.B., Griesser H., Mak T.W. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 1995; 270:985-988.
21. Mellor A.L., Munn D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:762-774.
22. Wing .K, Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322:271-275.
23. Zheng X.X., Markees T.G., Hancock W.W., Li Y., Greiner D.L., Li X.C., Mordes J.P., Sayegh M.H., Rossini A.A., Strom T.B. CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. *J Immunol* 1999; 162:4983-4990.
24. Tsai M.K., Ho H.N., Chien H.F., Ou-Yang P., Lee C.J., Lee P.H. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 2004; 77:48-54.
25. Dengler T.J., Szabo G., Sido B., Nottmeyer W., Zimmerman R., Vahl C.F., Hunig T., Meuer S.C. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 1999; 67:392-398.
26. Dong V.M., Yuan X., Coito A.J., Waaga A.M., Sayegh M.H., Chandraker A. Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73:1310-1317.
27. Guillonneau C., Seveno C., Dugast A.S., Li X.L., Renaudin K., Haspot F., Usal C., Veziere J., Anegon I., Vanhove B. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40lg-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 2007; 179:8164-8171.
28. Louis S., Braudeau C., Giral M., Dupont A., Moizant F., Robillard N., Moreau A., Souillou J.P., Brouard S. Contrasting CD25hiCD4+ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operationaldrug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81:398-407.
29. Winstead C.J., Fraser J.M., Khoruts A. Regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T Cells Selectively Inhibit the Spontaneous Form of Lymphopenia-Induced Proliferation of Naive T Cells. *J Immunol* 2008; 180:7305-7317.
30. Casati C., Camisaschi C., Novellino L., Mazzocchi A., Triebel F., Rivoltini L., Parmiani G., Castelli C. Human lymphocyte activation gene-3 molecules expressed by activated T cells deliver costimulation signal for dendritic cell activation. *J Immunol* 2008; 180:3782-3788.
31. Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S., Vignali D.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450:566-569.
32. Chen W., Jin W., Wahl S.M. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 188:1849-1857.
33. Oida T., Xu L., Weiner H.L., Kitani A., Strober W. TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *J Immunol* 2006; 177:2331-2339.
34. Gorelik L., Flavell R.A. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000; 12:171-181.
35. Fahlen L., Read S., Gorelik L., Hurst S.D., Coffman R.L., Flavell R.A., Powrie F. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201:737-746.
36. Puccetti P., Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:817-823.
37. Sarigul M., Yazisiz V., Bassorgun C., Ulker M., Avci A., Erbasan F., Gelen T., Gorczynski R., Terzioğlu E. The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome *Lupus*, February 1, 2010; 19(2): 138-145

38. **Christodoulou I., Kapsogeorgou E.K., Moutsopoulos N.M., Moutsopoulos H.M.** Foxp3⁺ T-Regulatory Cells in Sjögren's Syndrome Correlation with the Grade of the Autoimmune Lesion and Certain Adverse Prognostic Factors, *American Journal of Pathology*. 2008; 173:1389-1396.
39. **Katsifis G.E., Rekkas S., Moutsopoulos N.M., Pillemer S., Wahl S.M.** Systemic and Local Interleukin-17 and Linked Cytokines Associated with Sjögren's Syndrome Immunopathogenesis *Am. J. Pathol.*, September 1, 2009; 175(3): 1167-1177.
40. **Li X., Li X., Qian L., Wang G., Zhang H., Wang X., Chen K., Zhai Z., Li Q., Wang Y., Harris D.C.** T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2007, 34:2438-2445
41. **Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A.** CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006, 203:1701-171
42. **Katsiogiannis S., Kapsogeorgou E.K., Manoussakis M.N., Skopouli F.N.** Salivary gland epithelial cells: a new source of the immunoregulatory hormone adiponectin. *Arthritis Rheum* 2006, 54:2295-2299