



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS EN
PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

MARÍA INÉS VARGAS ROJAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE CARLOS ALCOCER VALERA

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 47950/A-1).

Un agradecimiento especial a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la beca otorgada.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 Células Treg en salud y enfermedad de humanos.....	11
2.2 Historia.....	12
2.3 Caracterización fenotípica.....	13
2.4 Mecanismo de acción.....	15
2.5 Origen y desarrollo.....	16
2.6 Participación de las células Treg en salud y enfermedad.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS.....	23
6. PACIENTES Y MÉTODOS.....	24
6.1. Pacientes.	24
6.2 Citometría de flujo.	25
6.3 Aislamiento y cultivos celulares.	26
6.4 Expresión del gen de FOXP3.	26
6.5 Tinción con el CFSE.	27
6.6 Cultivos celulares y ensayos de supresión.	27
6.7 <i>Cuantificación de la proliferación.</i>	28
6.8 Análisis estadístico.....	28

7. RESULTADOS.....	29
7.1 Cuantificación de células Treg en sangre periférica.....	29
7.2 Expresión de IL-2 e IL-10 intracitoplásmica en las células Treg...29	29
7.3 Expresión de mRNA de FOXP3 en células CD4⁺CD25⁺	31
7.4 Ensayos de proliferación celular.	32
8. DISCUSIÓN.....	40
9. BIBLIOGRAFIA.....	44

RESUMEN

Trabajos previos sugieren que las células T reguladoras (Treg) de los pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) presentan anomalías. En este trabajo cuantificamos las células Treg CD4⁺FOXP3⁺ de los pacientes con LEG y no encontramos alteraciones. Sin embargo, observamos un defecto claro en los ensayos de supresión.

Las células Treg derivadas de los pacientes con LEG tienen fenotipo y capacidad funcional normales. Controversialmente las células T efectoras CD4⁺CD25⁻ derivadas de pacientes con LEG resisten la supresión por las células Treg, ya sean autólogas o alogénicas.

Nuestros hallazgos sugieren que el defecto en la supresión en las células T observado en LEG es debido a la resistencia de las células efectoras y no a una función reguladora anormal.

ABSTRACT

Previous reports have suggested that regulatory T cells (Treg) are abnormal in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). In the present work, we quantified CD4+FOXP3+ Treg cells in patients with SLE and found no quantitative alterations. However, we found a clear defect in suppression assays.

Surprisingly, SLE-derived Treg cells exhibited a normal phenotype and functional capacity.

Conversely, SLE-derived CD4+CD25- effector T cells resisted suppression by autologous and allogeneic regulatory cells. Our findings strongly suggest that the defect in T-cell suppression observed in SLE is because of effector cell resistance and not because of an abnormal regulatory function.

1. INTRODUCCIÓN.

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune crónica, de etiología no determinada, se han descrito muchas alteraciones en el sistema inmunológico de estos pacientes como defectos en la producción de citocinas por las células T, así como cambios en su capacidad de activación, proliferación y en la expresión de moléculas de superficie¹. Si bien no se conoce la causa de esta enfermedad se sabe que existe una importante alteración en los mecanismos de tolerancia.

Dentro de este amplio campo de estudio en los últimos años creció el interés por estudiar la supresión mediada por células T como un mecanismo de regulación para mantener un estado de tolerancia a lo propio. Con la caracterización fenotípica de una subpoblación de células T naturalmente anérgica y supresora denominada células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Treg)², se retomó el concepto planteado en la década de los '70, cuando se demostró la presencia de un fenómeno de supresión mediado por linfocitos T o sus productos³.

En la última década aumentó el interés por estudiar esta subpoblación de células T, que mediante la supresión, participan en mecanismos de regulación inmunológica. Se demostró que ratones silvestres, depletados de células Treg, desarrollan enfermedades autoinmunes de forma similar a las que se encuentran en humanos, más importante aún, al reconstituir a estos ratones con la población de células Treg se inhibe el desarrollo de enfermedad⁴⁻⁷. En humanos se ha

demostrado la capacidad supresora *in vitro* de esta subpoblación celular⁸⁻¹⁰, se confirmó la presencia de células T autoreactivas en sangre periférica de individuos sanos, y que la expansión de estas células es suprimida por la presencia de las células Treg¹¹.

Las células Treg tienen marcadores de superficie celular operacionalmente diferentes, más no exclusivos^{2, 4 y 7}, lo que dificulta su identificación y aislamiento para estudios funcionales, esta subpoblación se caracteriza por la expresión de un marcador de activación (CD25) y una molécula de coestimulación el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4 por sus siglas en inglés) común a otras poblaciones celulares después de ser activadas sin embargo, las células Treg expresan ambos marcadores de forma constitutiva.

En humanos estas células representan entre el 2 y 6% de los linfocitos T CD4⁺ y las células con capacidad reguladora son las que tienen alta expresión de la cadena α del receptor de interleucina2 (IL-2), el CD25¹⁰⁻¹² que se encuentra en todas las células T después de ser activadas, sin embargo su expresión es constitutiva en la población de células Treg.

Las células Treg de humanos expresan mRNA del factor de transcripción FOXP3¹³, este marcador al igual que CD25 es común tanto en células Treg de humanos como de ratones¹⁴ y se considera, como un marcador molecular que no solo da una característica fenotípica exclusiva a esta población, es también determinante para su origen y función.

Se sabe que uno de los mecanismos de tolerancia periférica está dado por la existencia de estas células Treg¹⁵⁻¹⁸, si bien los mecanismos moleculares por los cuales estas células derivan y actúan, no están bien definidos se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* defectos en la capacidad reguladora de esta subpoblación celular relacionados con enfermedades autoinmunes^{19 y 20}.

Si bien ya se confirmó la existencia de una población de células reguladoras, el mecanismo de acción por el cual suprimen no está del todo claro, algunos trabajos proponen un mecanismo dependiente de citocinas y otros apoyan la teoría de un mecanismo dependiente de contacto celular.

La participación de citocinas, especialmente de la interleucina 10 (IL-10), en la acción supresora de las células Treg fue muy estudiada en la enfermedad inflamatoria intestinal de modelos murinos sin embargo, la participación de esta y del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es todavía controversial²¹.

En modelos *in vitro* las células Treg humanas se activan a través de su receptor de célula T (TCR) y es necesaria una señal de coestimulación a través del CD28²². Se observó que al separar las células con membranas semipermeables se evitaba la acción supresora, pues es a través del contacto celular que las células Treg se activan y como estas tienen expresión constitutiva de CTLA-4, este compite con CD28 por los sitios de unión y así por ausencia de una señal de coestimulación positiva la presentación antigénica es insuficiente y

se establece un estado de anergia. Otro mecanismo molecular propuesto, también dependiente de contacto celular, es que la unión del CTLA-4 a su ligando inicia una vía de señalización negativa y esto resulta en células T que no proliferan ya sea, por efecto directo del contacto celular o bien por acción de factores humorales como IL-10 o TGF- β producidos por las células Treg. Se ha demostrado que se necesita de una interacción directa y del contacto entre células CD4⁺CD25⁻ y células Treg para la inmunoregulación ²³.

En humanos se ha descrito una disminución cuantitativa de la población de células Treg en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) ^{24 y 25}, sugiriendo así la participación de estas células en la patogénesis de la enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Las células Treg en salud y enfermedad de humanos.

El sistema inmune distingue lo propio de lo ajeno y de esta manera es capaz de mantener un estado de tolerancia contra antígenos propios. El primer mecanismo de tolerancia antígeno específica es la eliminación, en el timo, de células T autoreactivas. Este mecanismo de eliminación no es 100% eficiente y existen células T con alta afinidad por antígenos propios que escapan de este proceso de selección y migran a la periferia y en este caso, son los mecanismos de tolerancia periférica, los encargados de controlar estas células T autoreactivas.

Entre los mecanismos de tolerancia periférica pasiva está la anergia, mediante la cual se controla a las células T que reconocen auto antígenos, sin embargo no siempre es suficiente este mecanismo para mantener un estado de tolerancia. Durante los últimos 15 años surgió evidencia que habla sobre la existencia de un mecanismo activo de tolerancia periférica, el cual depende, de la presencia de una subpoblación de linfocitos T con funciones supresoras, esta población denominada como células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Treg) fue descrita en 1995, inicialmente en modelos animales ¹, cuando se demostró, que la administración de células Treg a ratones nu/nu podía prevenir el desarrollo de gastritis autoinmune; estudios posteriores determinaron que estas células, también eran capaces de inhibir el desarrollo de enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, encefalitis autoinmune experimental y enfermedad injerto

contra huésped²⁻⁷; de esta manera se confirmó la importante participación de esta población en la supresión de células T autoreactivas en modelos animales.

En humanos se ha demostrado la capacidad supresora *in vitro* de esta población celular en células T efectoras⁸⁻¹⁰, y que la expansión de las células T autoreactivas en sangre periférica de individuos sanos es suprimida por la presencia de células Treg¹¹.

Después de más de una década de investigación en modelos animales y el aporte en los últimos años de estudios en humanos, es evidente la participación de células Treg en la respuesta inmune, autoinmunidad e infecciones^{9, 12-15}.

El estudio de las células Treg en la respuesta inmune, es un claro ejemplo de la interacción entre la investigación básica en modelos animales tanto *in vivo* como *in vitro*, y la investigación clínica, lo que valida la investigación *in vitro* de esta subpoblación celular en procesos de salud y enfermedad de humanos.

2.2 Historia.

Después del descubrimiento en 1960, de las funciones de los linfocitos T cooperadores (Th) y los linfocitos B, Gershon R.K. propuso la existencia de una población de células que denominó reguladoras, que suprimían la respuesta inmune¹⁶. En la década de los '70 se sugirió que las células supresoras mediaban efectos biológicos al producir sustancias solubles; a pesar de que numerosos

experimentos proporcionaban datos que hablaban de la existencia de una población de células supresoras esta teoría fue descartada en la década de los '80 ya que el descubrimiento de las células Th1 y Th2 proponía que la supresión era el resultado de la actividad de citocinas inmunoreguladoras ¹⁷.

El descubrimiento de las células Treg se basa en una observación *in vivo*, ya que ratones timectomizados el tercer día de vida (d3Tx) desarrollan enfermedad autoinmune ¹⁷⁻¹⁹ posteriormente Sakaguchi y colaboradores demostraron que la eliminación de células Treg causa enfermedad autoinmune en ratones d3Tx ²⁰⁻²² y que su transferencia las previene, estos datos rescataron el concepto propuesto por Gershon R.K. sobre la existencia de una población de células reguladoras.

Actualmente se define a esta población como células con poca capacidad para proliferar, poca o nula producción de IL-2, con capacidad de inhibir la producción de dicha citocina por otras poblaciones celulares y por ende capacidad de suprimir la proliferación de las mismas.

2.3 Caracterización fenotípica .

Durante los diez último años se ha buscado la manera de poder caracterizar a las células Treg, en el intento de buscar algún marcador exclusivo que las identifique se hicieron numerosos experimentos, debido a que esta subpoblación de células T expresa marcadores de activación y memoria que son comunes a los expresados por células T recién activadas, sin embargo las células Treg los

expresan de forma constitutiva, tales como el CD25, CTLA-4, la proteína relacionada al TNFR inducida por glucocorticoides (GITR) y el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) ²³ .

La población de células Treg fue aislada de timo y sangre periférica de humanos ²⁴⁻²⁶, estas representan entre el 5 al 10% del total de timocitos CD4⁺CD8⁻ maduros y el 2 al 6% del total de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica ^{8, 25 y 27}, en humanos las células CD4⁺CD25⁺ con capacidad reguladora son aquellas que tienen alta expresión del receptor α de IL-2 (CD25^{hi}) y el 95% de estas células tiene una expresión homogénea de CD45RO, CD62L, GITR y CD122 ^{9 y 28} .

Carmalho y colaboradores reportaron que las células Treg expresan receptores tipo Toll (TLR) entre los que están el 4, 5, 7 y 8 sin embargo ninguno es exclusivo de esta población celular ²⁹ .

A partir del descubrimiento de la participación de FOXP3 en la función de células Treg ^{30 y 31} y la observación previa con base en la descripción de 1982, del síndrome de inmunodeficiencia ligado al cromosoma X asociado a enfermedad autoinmune en órganos endocrinos (IPEX) ³² y que este síndrome es similar al que desarrollan los ratones deficientes de FoxP3 ³³; se estableció una clara y directa correlación entre células Treg de animales y humanos. Recientemente se reportó que las células Treg de humanos expresan mRNA de FOXP3 ³⁴, este factor de transcripción es un marcador molecular que no solo confiere una característica

fenotípica exclusiva a esta población, sino que también determina su origen y función.

2. 4 Mecanismo de acción.

Si bien ya se confirmó la existencia de una población de células reguladoras, el mecanismo de acción por el cual suprimen no está del todo claro, algunos trabajos proponen un mecanismo dependiente de citocinas y otros apoyan la teoría de un mecanismo dependiente de contacto celular.

La participación de citocinas, especialmente de IL-10, en la acción supresora de células Treg fue muy estudiada en la enfermedad inflamatoria intestinal de murinos sin embargo la participación de ésta y del TGF- β es todavía controversial ²³.

En modelos *in vitro* las células Treg humanas se activan a través de su receptor de célula T (TCR) y es necesaria una señal de coestimulación a través de CD28 ³⁵, se observó que al separar las células con membranas semipermeables se evita la acción supresora, pues es a través del contacto celular que las células Treg se activan y como estas tiene expresión constitutiva de CTLA-4, este compite con CD28 por los sitios de unión, así por ausencia de una señal de coestimulación la presentación antigénica es insuficiente y hay anergia. Otro mecanismo molecular propuesto, también dependiente de contacto celular, es que la unión de

CTLA-4 a su ligando inicia una vía de señalización negativa y esto resulta en células T que no proliferan ya sea por efecto directo del contacto celular o bien por acción de factores humorales como IL-10 o TGF- β producidos por las células Treg. Estudios recientes demuestran que la interacción directa y el contacto entre células CD4⁺CD25⁻ y células Treg es necesario para la inmunoregulación³⁶.

Se ha reportado que las células Treg disminuyen la expresión de CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno³⁷ lo que sugiere otro mecanismo de supresión. In vivo las células Treg regulan la respuesta inmune de diferentes maneras, dependiendo posiblemente, del estímulo, del lugar y del entorno de citocinas .

2.5 Origen y desarrollo.

En modelos animales se confirmó la indispensable participación del timo en la ontogenia de células Treg ya que los ratones timectomizados carecen de esta población celular y desarrollan las mismas enfermedades autoinmunes que aquellos animales depletados de células Treg²¹.

El desarrollo de esta población celular requiere de la interacción del TCR con el complejo MHC + péptido propio expresado en el estroma tímico³⁸, ésta se ha descrito, como la tercera función del timo³⁹.

En humanos la participación del timo en la ontogenia de las células Treg fue reportada por Norihiko y colaboradores quienes observaron el importante papel de los corpúsculos de Hassall para la formación de esta población celular, este grupo demostró *in vitro*, que estos corpúsculos localizados en la médula del timo tienen un papel muy importante en la coordinación de tolerancia, sin participar en la eliminación clonal, estos convierten a los timocitos con alta afinidad por antígenos propios y potencialmente autoreactivos en células Treg⁴⁰.

La gran similitud entre la mutación de FoxP3/FOXP3 (en ratones y humanos respectivamente) y la depleción de células Treg en los modelos estudiados lleva a establecer una relación entre el desarrollo y la función de estas células y el gen, por esto se considera que las células Treg naturales son aquellas que expresan este factor de transcripción y que este, no es solo necesario para la ontogenia sino también para la regulación. En modelos animales se demostró que al aumentar la expresión de FoxP3, aumenta el número de células Treg y la transducción con un retrovirus de este gen a células CD4⁺CD25⁻ confiere a estas últimas, capacidad supresora^{30, 31 y 41}, las células Treg de humanos tienen un fenotipo y función comparable al de las células Treg de roedores.

2.6 Participación de las células Treg en salud y enfermedad.

En modelos animales, al igual que en humanos, la deficiencia congénita de células Treg causa defectos en inmunoregulación, tolerancia a lo propio y alergia³³.

Está bien establecido que esta población celular participa de forma activa en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia a lo propio, y en el control negativo de varias respuestas inmunes contra antígenos extraños²³.

El estudio de células Treg en humanos es complicado por las características que estas células presentan, si bien diferentes grupos han evaluado su capacidad supresora, los resultados son diferentes⁴², y esta diferencia puede ser explicada por la dificultad de obtener esta población celular para ensayos *in vitro*, ya que al aislar estas células a partir de sangre periférica, los cultivos se realizan con todas las células que expresan CD25, ya sea por estar recién activadas o bien, porque a pesar de tener expresión del mismo, carecen de función reguladora ya que está bien establecido que en humanos, las células con capacidad reguladora son únicamente aquellas con alta expresión de CD25 en su superficie. Las células CD4⁺CD25^{hi}, responden poco a la estimulación antigénica *in vitro* (anergia) y son capaces de suprimir la proliferación celular de otras poblaciones de células T en cocultivos²⁷. Los resultados obtenidos en estudios relacionados a procesos de salud y enfermedad, deben ser analizados tomando en cuenta esta dificultad técnica, en cuando a la obtención y pureza de células Treg en humanos.

Células T reguladoras y embarazo. Medawar en 1953, propuso que durante el embarazo participan mecanismos de tolerancia inmunológica para proteger al producto de la respuesta alogénica materna. El 2004 Aluvihare y colaboradores demostraron que en ausencia de células CD4⁺CD25⁺ durante el periodo gestacional, se produce una reacción inmunológica contra el feto lo que sugiere una importante participación de esta población en la tolerancia materna ^{43 y 44}.

En humanos se ha reportado un aumento de células CD4⁺CD25^{hi} en la decidua y sangre periférica durante el embarazo, el aumento de esta población es mayor en etapas tempranas de la gestación, presentan un pico máximo en el segundo trimestre y disminuyen en la etapa post parto ^{45 y 46}. Aunque no se conocen los factores que regulan estas células, recientemente se reportó la participación del estrógeno en el aumento de la expresión de FoxP3 *in vitro* e *in vivo*, en ratones tratados con estrógeno, aumenta el número de células CD4⁺CD25⁺, estos resultados sugieren una vía por la cual esta población aumenta durante la gestación para promover la tolerancia materna al feto ⁴⁷. Las células Treg son muy importantes para el desarrollo de un embarazo normal, un defecto en el reclutamiento y función de estas, puede llevar a condiciones patológicas como abortos espontáneos, trabajo de parto pre termino o pre eclamsia ⁴².

Células T reguladoras y enfermedades infecciosas. Como las células Treg expresan TLR, los productos microbianos, favorecen directamente su función. Estas células tienen un efecto inhibitor en la respuesta Th1, promueven la polarización hacia Th2 y de esta forma se protege al huésped del daño que puede

causar un proceso inflamatorio. La función de esta población celular es responder a las señales asociadas a destrucción tisular y minimizar el daño colateral en tejidos ⁴⁸. En humanos se han asociado defectos en la población de células Treg y enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter pylori*, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis C (VHC) y citomegalovirus ⁴⁹⁻⁵⁵.

En modelos animales se demostró que la acumulación de células Treg en sitios de infección, limita la eficacia de una respuesta Th1, como consecuencia estas células promueven la persistencia y potencial transmisión del agente patógeno ⁵⁶. En biopsias de hígado, de pacientes con hepatitis C, se ha encontrado una correlación inversa entre el número de Treg en sangre periférica y el grado de inflamación histológica ⁵⁵.

Se ha reportado una disminución de células Treg en sangre periférica de pacientes sintomáticos infectados con VIH o VHC, la continua acumulación de estas células en los sitios de infección rompe la homeostasis en los órganos infectados y esto lleva a una inmunosupresión local, en algunos casos se ha visto que el aumento de células Treg puede causar reactivación de una enfermedad ⁵⁷.

En modelos animales con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) la progresión de la enfermedad se asocia con aumento de las células Treg en la periferia ⁵⁸, en humanos la evidencia disponible en modelos *in vitro*, indica que la infección por VIH se controla con la presencia de esta población celular ⁵⁰⁻⁵²; sin

embargo en otras enfermedades infecciosas como la malaria, estas células no muestran un efecto protector, recientemente se reportó que en humanos, al igual que en modelos animales, la presencia de las células Treg abate la respuesta inmune en contra del parásito. Walter M. Y colaboradores demostraron que en presencia de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ se modifica el curso de la infección en sangre, hay mayor producción de TGF- β , disminuye la producción de citocinas proinflamatorias y la respuesta inmune antígeno específica, por esto aumenta la sobrevivencia de *P. falciparum*⁵⁹.

Las células $CD4^+CD25^+$ regulan la respuesta inmune, pero la modulación excesiva, favorece la supervivencia del patógeno y en muchos casos la persistencia del mismo, llevando a la infección, a la cronicidad.

Células T reguladoras y enfermedades autoinmunes. La patogénesis de las enfermedades autoinmunes no está del todo entendida, y son mecanismos multifactoriales los que finalmente llevan al inicio y mantenimiento de las mismas. Si bien no se conoce la causa de muchas de estas enfermedades, se sabe que existe una importante alteración en los mecanismos de tolerancia a lo propio; se han reportado defectos cuantitativos y cualitativos en la población de células Treg en pacientes con enfermedades autoinmunes, dentro de este amplio campo de estudio, en los últimos años creció el interés por estudiar la supresión mediada por células T como un mecanismo de regulación.

Pacientes con LEG y diabetes autoinmune tienen menos células CD4⁺CD25⁺ en sangre periférica⁶⁰⁻⁶². En esclerosis múltiple las células Treg de los pacientes suprimen tan solo un 20% de la proliferación celular; mientras que las células de los controles suprimen el 80% de la proliferación¹². En artritis reumatoide se ha sugerido que las células Treg presentan defectos en la producción de citocinas y, en aquellos pacientes, tratados con anti TNF- α no solo aumenta el número de células Treg, sino también, su capacidad supresora¹⁴. También se ha reportado disminución de la capacidad supresora en pacientes con síndrome autoinmune poliglandular tipo II y en pacientes con miastenia gravis autoinmune^{13 y 63}.

La evidencia disponible sugiere una importante participación de las células T reguladoras CD4⁺CD25^{hi} en la modulación de la respuesta inmune contra antígenos propios y agentes infecciosos en humanos.

3. JUSTIFICACIÓN.

La evidencia en modelos animales sugiere que la subpoblación de linfocitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Treg) puede jugar un papel importante en el origen y la perpetuación del trastorno de tolerancia periférica que exhiben los pacientes con LEG. Conocer el comportamiento de esta subpoblación celular en pacientes con LEG permitirá definir su participación en la patogénesis de la enfermedad y eventualmente, sugerir mejores estrategias terapéuticas.

4. HIPÓTESIS.-

Las células Treg de pacientes con LEG presentan alteraciones cuantitativas y funcionales.

5. OBJETIVOS.

1. Investigar si la subpoblación de células Treg presenta alteraciones cuantitativas o cualitativas en pacientes con LEG.
2. Investigar la capacidad proliferativa de las células CD4⁺CD25⁺ y la capacidad de inhibir la proliferación de células CD4⁺CD25⁻.

3. Determinar si existen diferencias en las citocinas producidas por las células CD4+CD25+ de pacientes con LEG.
4. Investigar si las alteraciones en la función de estas células se relacionan con las manifestaciones clínicas y actividad de la enfermedad.

6. PACIENTES Y MÉTODOS.

6.1. *Pacientes.*

Se incluyeron a 20 pacientes (10 con enfermedad activa y 10 en remisión), que no recibían tratamiento específico para LEG en el momento del estudio (corticoesteroides e inmunosupresores) y 20 controles sanos pareados por edad y género. Todos los pacientes cumplían con al menos cuatro de los once criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR) ²⁶. La actividad de la enfermedad se cuantificó con la escala de actividad MEX-SLEDAI ²⁷; se definió remisión de la enfermedad como al menos un año sin ningún dato de actividad (MEX-SLEDAI igual a cero) y sin ningún tratamiento indicado para el LEG. Los datos generales y clínicos de pacientes y controles se presentan en la tabla 1. Este estudio fue aprobado por el comité de ética del INCMNSZ, la participación fue voluntaria y todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Tabla 1. Características generales y demográficas de pacientes y controles

	LEG		Controles
	Activo	Remisión	
Número	10	10	20
Edad (media ± DE)	29 ± 4.5	40.8 ± 14.5	34.5± 9.0
Género (M/F)	1/9	0/10	1/17
Años con diagnóstico de LEG	1 ± 1.8	17.9 ± 6.6	-
MEX-SLEDAI	9.3 ± 2.0	0	-

6.2 Citometría de flujo.

Mediante citometría de flujo de doble marcaje, se cuantificó en sangre periférica la población de células CD4⁺CD25^{Hi}, anti-CD4-FITC y anti-CD25-PE (Beckton Dickinson (BD) Biosciences, San Diego, CA). Tanto para la identificación de las citocinas (anti-IL-2-FITC, anti-IL-10-FITC, Diaclone, Besançon, France) como para el FOXP3 (anti-FOXP3-FITC eBioscience, San Diego, CA) se realizó un protocolo de permeabilización celular con Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) .

Para cuantificar el logaritmo de fluorescencia se usó el citómetro FACScan, con el programa CellQuest (BD), se realizó el análisis de 10 000 eventos de la población linfocida seleccionada por tamaño y granularidad.

6.3 Aislamiento y cultivos celulares.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica a partir de la centrifugación de sangre heparinizada a través de gradiente de densidad (Lymphoprep Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) Se obtuvieron células CD4⁺CD25⁺ mediante selección positiva usando columnas y perlas magnéticas (CD4 T Cell Isolation Kit II. Microbrads Miltenyi Bistec) y por selección negativa se obtuvieron las células CD4⁺CD25⁻ (CD25 Microbrads Miltenyi Bistec).

6.4 Expresión del gen de FOXP3.

El RNA total se extrajo de 1 millón de células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ respectivamente, usando la técnica de Trizol (Gibco-BRL) se obtuvo el cDNA de 2µg de RNA (Monoley murine leukemia virus reverse transcriptase, Gibco-BRL).

La amplificación del cDNA de FOXP3 fue realizada con *primers* sentido y antisentido específicos (5'-TCA AGC ACT GCC AGG CG-3' y 5'-CAG GAG CCC TTG GAT -3'; respectivamente) a la 30 pM cada una, y 2 unidades de Taq polimeraza (Gibco-BRL), usando estos primers La PCR permitió un amplicon de 100 pares de base.

6.5 Tinción con el CFSE.

Antes de la incubación las células se tiñeron con el fluorocromo 5(6)-Carboxifluorescein diacetato N-succinimidil ester (CFSE Biochemika, Fluka Chemie, Steinheim, Switzerland). Las células se tiñeron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.6 Cultivos celulares y ensayos de supresión.

Las Células $CD4^+CD25^-$ y $CD4^+CD25^+$ (efectoras y reguladoras, respectivamente), fueron estimuladas solas y en cocultivos (en una proporción de 1:1) Se montaron los cultivos celulares (200 mil células en 200 μ l de RPMI 1640 suplementado con 2 nM L-glutamina, 100 U/ml penicilina/ μ g/ml estreptomicina y 5% de Suero Bovino Fetal) en placas de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, NY), con anti-CD3 (clona HIT3a, 10 μ g/ml) unido a la placa y anti-CD28 (clona 28.2, 0.25 μ g/ml) soluble. Los cultivos se hicieron por triplicado. Después de 96 horas de cultivo en incubadoras a 37°C y 5% de CO₂ se analizó la proliferación celular mediante citometría de flujo.

6.7 Cuantificación de la proliferación.

La proliferación celular fue medida de acuerdo a la dilución del CFSE, con este fin las diferentes generaciones de células fueron puestas en diferentes ventanas de acuerdo a sus niveles de CFSE, los cortes de estas ventanas fueron dirigidos por la plataforma de proliferación del software Flowjo (versión 7.2.2; Tree Star, Inc.). La frecuencia de cada generación fue incorporada dentro de un algoritmo que asigna un valor diferente para cada población de acuerdo a las veces que esta se ha dividido: $\sum M_n \cdot 2^{n-1}$, donde M_n es el porcentaje de células contenidas dentro de cada una de estas ventanas y n representa la ventana que está siendo analizada. El resultado se expresó en unidades arbitrarias referidas como índice de proliferación celular (IPC). El IPC fue validado en experimentos iniciales, los resultados obtenidos por la fórmula se correlacionaron a las medidas de proliferación celular con la captación de timidina tritiada ($R=0.92$, $P<0.0001$).

6.8 Análisis estadístico.

Los valores descriptivos de las variables fueron expresados como la media \pm el error estándar promedio. Las variables con una distribución normal fueron analizadas con la prueba de t-Student's. Las variables que no tuvieron distribución normal con la prueba de Mann-Whitney. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

7. RESULTADOS.

7.1 Cuantificación de las células Treg en sangre periférica.

A partir de sangre venosa se realizó una tinción de superficie para analizar la proporción de células CD4⁺CD25^{hi} ya que en humanos, estas se han reportado con capacidad reguladora ¹⁰.

El número de células CD4⁺CD25^{hi} es significativamente mas alto en individuos sanos (3.9% ± 1.6) al compararlas con los pacientes con enfermedad activa (1.4% ± 1.0, $P=0.01$) y en remisión (0.71% ± 0.8 $P<0.01$). Sin embargo, como el FOXP3 es un marcador más específico de la población de células Treg se cuantificaron las células positivas a la expresión intracelular de dicho marcador (células CD4⁺FOXP3⁺) tanto en pacientes como en controles. El porcentaje promedio (± DE) de las células CD4⁺FOXP3⁺ fue de 3.2 ± 2.2 en los controles y de 2.8 ± 2.1 en los pacientes con LEG, con estos resultados demostramos que no hay una disminución cuantitativa de las células Treg, definida como células CD4⁺FOXP3⁺ en pacientes con LEG.

7.2 Expresión de IL-2 e IL-10 intracitoplásmica en las células Treg.

Con el objetivo de identificar mejor a la población de células T obtenidas mediante selección en las columnas y perlas magnéticas , se realizó una identificación de IL-2 e IL-10 intracitoplásmica, tanto en la población de células

CD4⁺CD25⁺ (reguladoras) como en las células CD4⁺CD25⁻ (efectoras) de pacientes y controles, de acuerdo a lo esperado las células Treg tienen baja expresión de IL-2 en comparación con la población de células T efectoras (16.9 ± 2.2 vs. 71.2 ± 5.1 , respectivamente; $P < 0.001$) la diferencia fue en células obtenidas tanto de pacientes como de controles. La expresión de IL-10 fue similar en ambas poblaciones (26.1 ± 5.4 en CD4⁺CD25⁺ vs. 38.3 ± 6.3 , en CD4⁺CD25⁻; $P = 0.10$) (Figura 1).

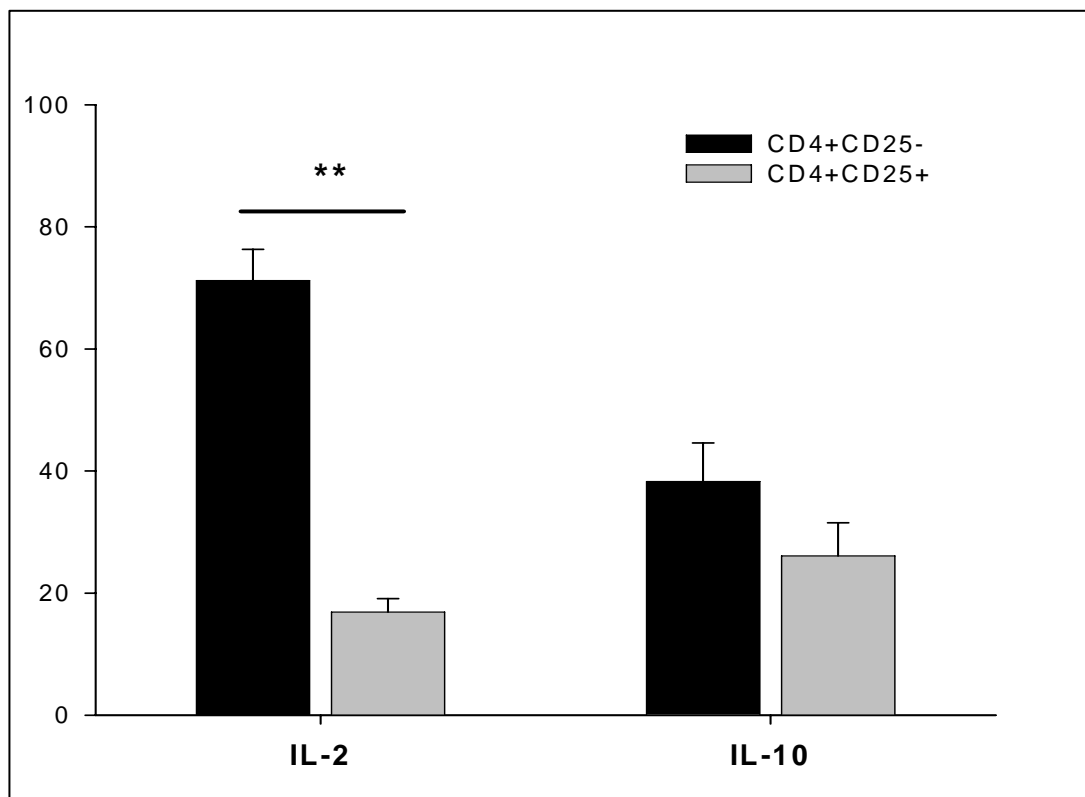


Figura 1. No hay diferencia en la expresión de citocinas entre pacientes y controles. Expresión intracitoplásmica de IL-2 e IL-10 en células aisladas mediante columnas de selección y perlas magnéticas, CD4⁺CD25⁻ (barra gris) y CD4⁺CD25⁺ (barra negra) de pacientes y controles.

7.3 Expresión de mRNA de FOXP3 en las células CD4⁺CD25⁺.

Como el factor de transcripción FOXP3 es un marcador molecular específico de las células Treg²⁸ se realizó una medición de mRNA de FOXP3 mediante RT-PCR en las células obtenidas de los pacientes y controles. Solo se encontró expresión de dicho factor de transcripción en la población de células CD4⁺CD25⁺ (Figura 2), confirmando de esta manera que la población de células CD4⁺CD25⁺ obtenidas por separación de las columnas y perlas magnéticas, usada para los cocultivos eran células Treg.

Con la finalidad de analizar si la expresión de FOXP3 era diferente en las células CD4⁺CD25^{hi} de los pacientes y controles cuantificamos su expresión intracelular. La intensidad media de fluorescencia (IMF) así como el porcentaje de células positivas fue similar en las células Treg derivadas de pacientes con LEG y las células Treg de los controles sanos (77.9 ± 12.3% vs. 76.7 ± 8.3%; IMF 125.5 ± 28.7 vs. 134.8 ± 26.9, respectivamente). Estos resultados muestran que no existen anomalías en el fenotipo de las células Treg obtenidas de los pacientes con LEG.

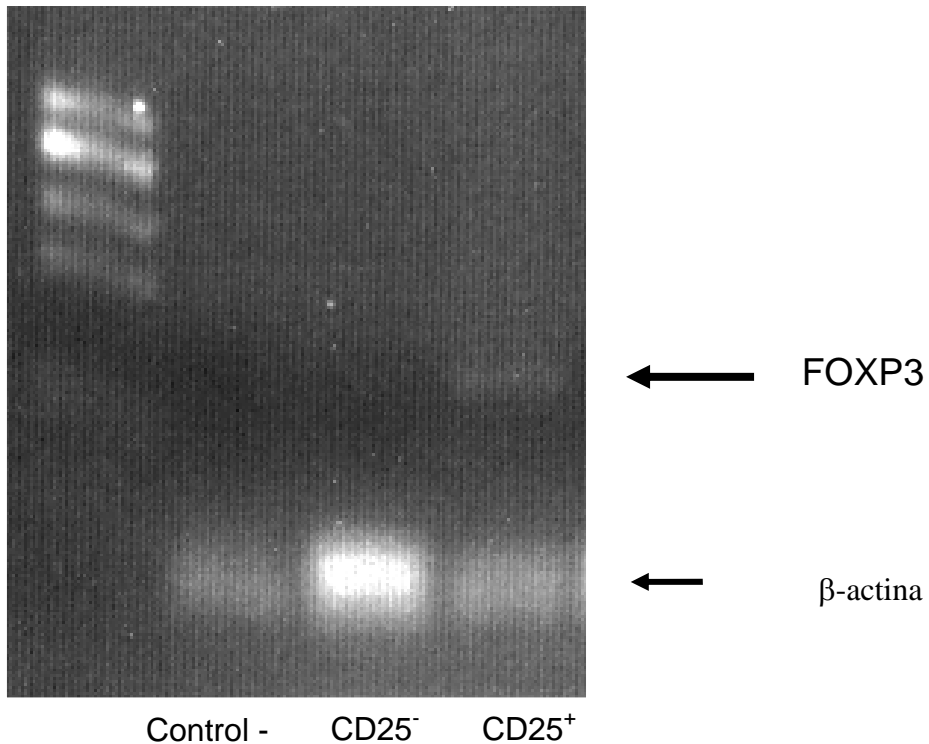


Figura 2. *Las células Treg expresan FOXP3.* Expresión de mRNA de FOXP3 por RT-PCR en células aisladas mediante columnas de selección y perlas magnéticas, CD4⁺CD25⁻ (3×10^6) y CD4⁺CD25⁺ (1×10^6) de pacientes y controles.

7.4 Ensayos de proliferación celular.

Para determinar las características funcionales de los subtipos de células aisladas, estimulamos las células T efectoras y Treg, cada una de manera separada o en un cocultivo autólogo con una relación 1:1 (Figura 3).

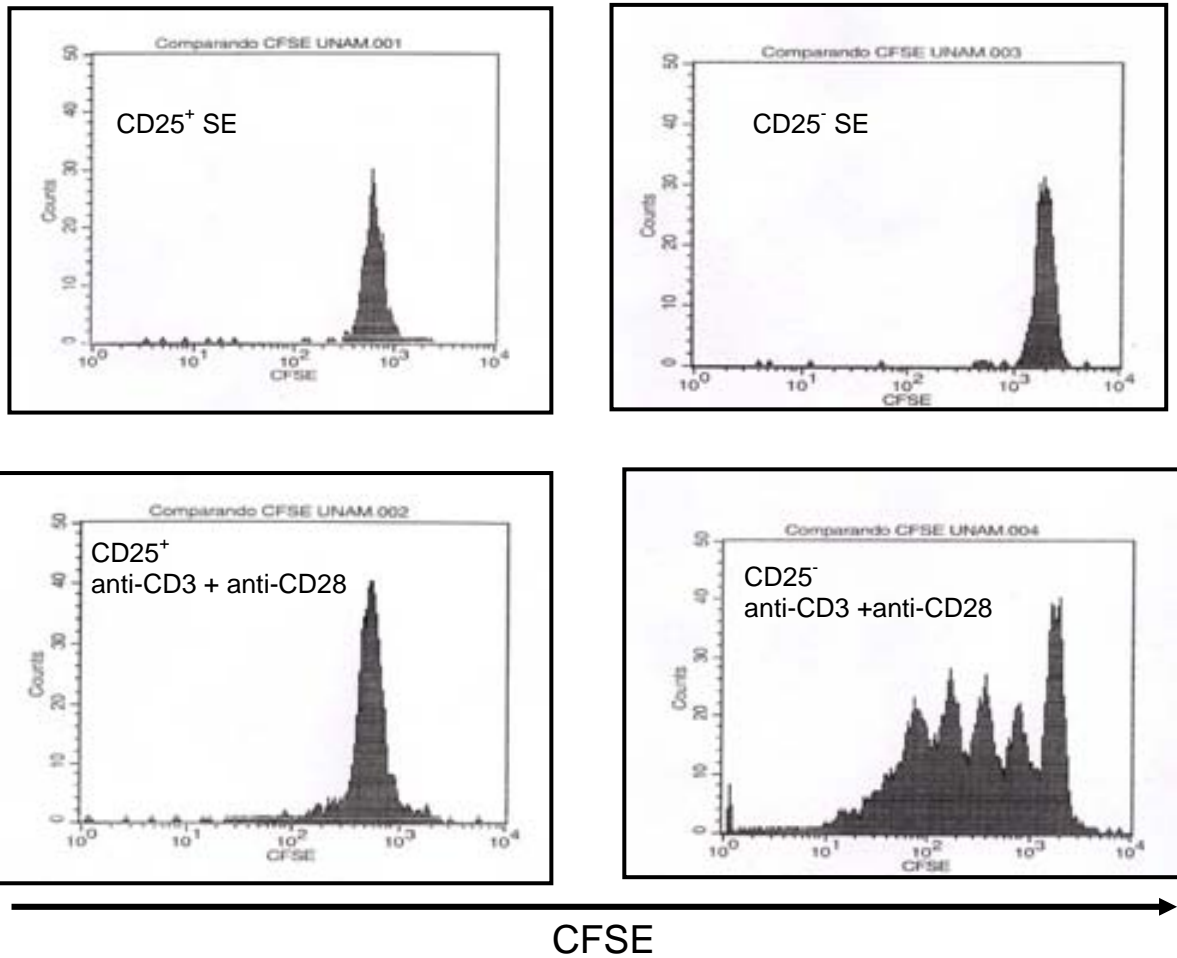


Figura 3. Las células Treg tienen poca capacidad para proliferar. Proliferación celular con CFSE en cultivos autólogos de células T reguladoras (CD25⁺ izquierda) y T efectoras (CD25⁻ derecha) después de 96 horas de cultivo sin estímulo (arriba) y con anti-CD3 unido a la placa y anti-CD28 soluble (abajo).

Las células CD4⁺CD25⁺ de los pacientes con LEG proliferaron de manera espontánea y cuando fueron estimuladas con anti-CD3 mas anti-CD28 (IPC 100 ± 42 y 433 ± 73 , respectivamente) las diferencias entre la proliferación de las células reguladoras obtenidas de los controles y de los pacientes con LEG fue estadísticamente significativa. Con la finalidad de cuantificar la proliferación celular incubamos las células T efectoras derivadas de los pacientes y los controles con y

sin estímulo Cuando son comparadas con las células de los sujetos normales, aquellas que son aisladas de los pacientes con LEG mostraron incremento espontáneo de la proliferación (6.83 ± 5.0 vs. 379.2 ± 162 , respectivamente; $P=0.002$) (Figura 4). Como era de esperarse las células normales proliferaron vigorosamente cuando fueron estimuladas, mientras que las células T efectoras de los pacientes con LEG tuvieron una respuesta inadecuada al estímulo (control 1642 ± 186 , LEG 688 ± 182 ; $P<0.001$).

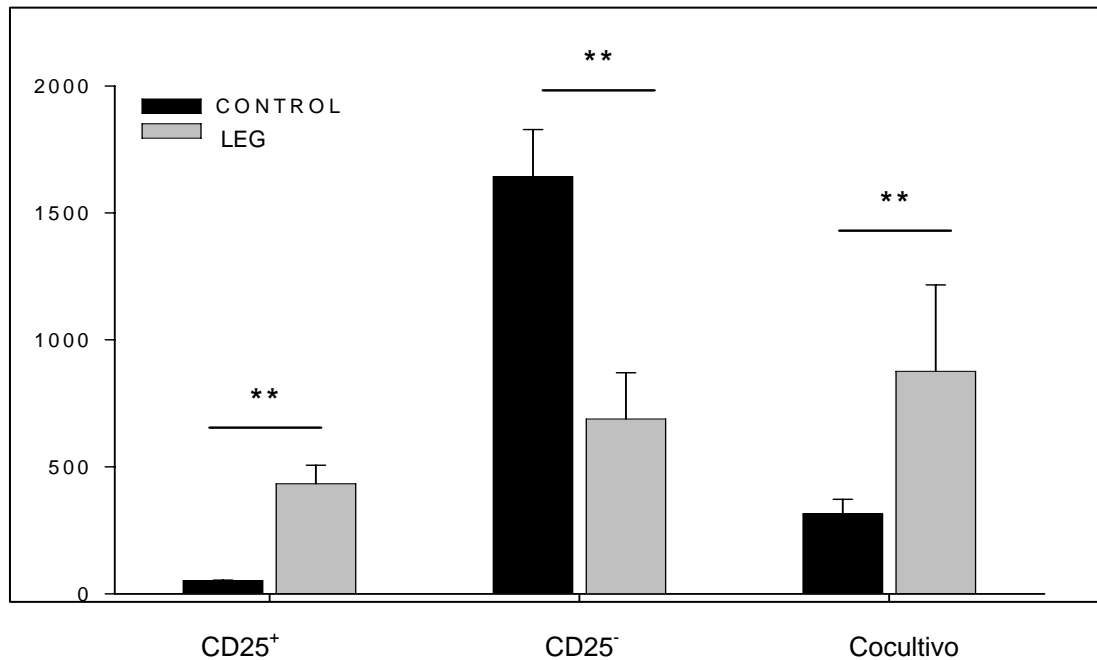


Figura 4. Menor supresión en la proliferación de células efectoras de pacientes. Proliferación celular con CFSE después de 96 horas de cultivo, de células T reguladoras (CD25⁺), T efectoras (CD25⁻) y en cocultivos autólogos (1:1) obtenidas de pacientes (barra gris) y controles (barra negra).

Al agregar células Treg a los cultivos de células T efectoras estimuladas se inhibió la proliferación de manera importante (77.3% de inhibición). Sin embargo, este fenómeno fue solamente observado en las células de los controles sanos (Figura 5). Cuando los cocultivos fueron preparados con células de los pacientes con LEG no se observó dicha inhibición. La presencia de células Treg derivadas de pacientes con LEG no hizo ninguna diferencia en la proliferación de las células T efectoras (solas 688 ± 182 vs. cocultivos 876 ± 340 , $P=0.70$), estos resultados se muestran en la figura 4. Ninguna de estas alteraciones demostró una correlación con la actividad de la enfermedad o con cualquier otra característica clínica particular.

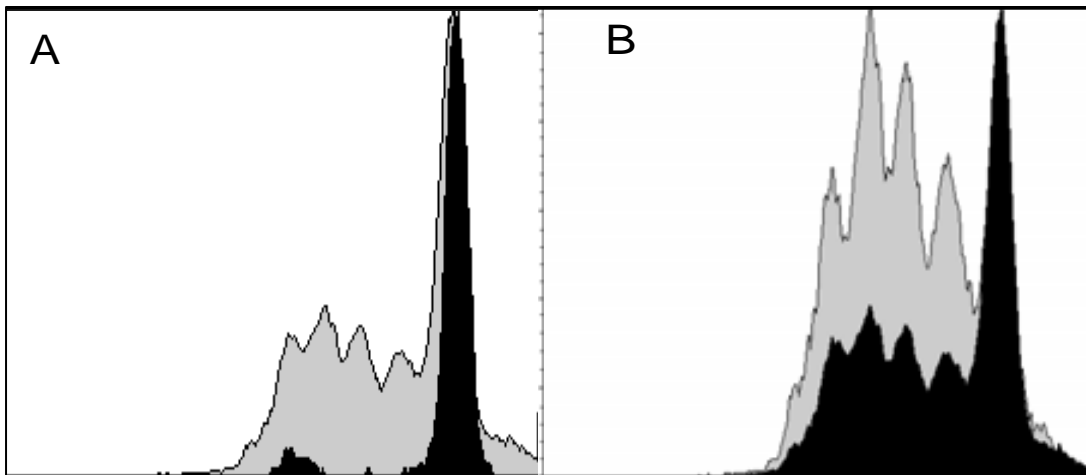
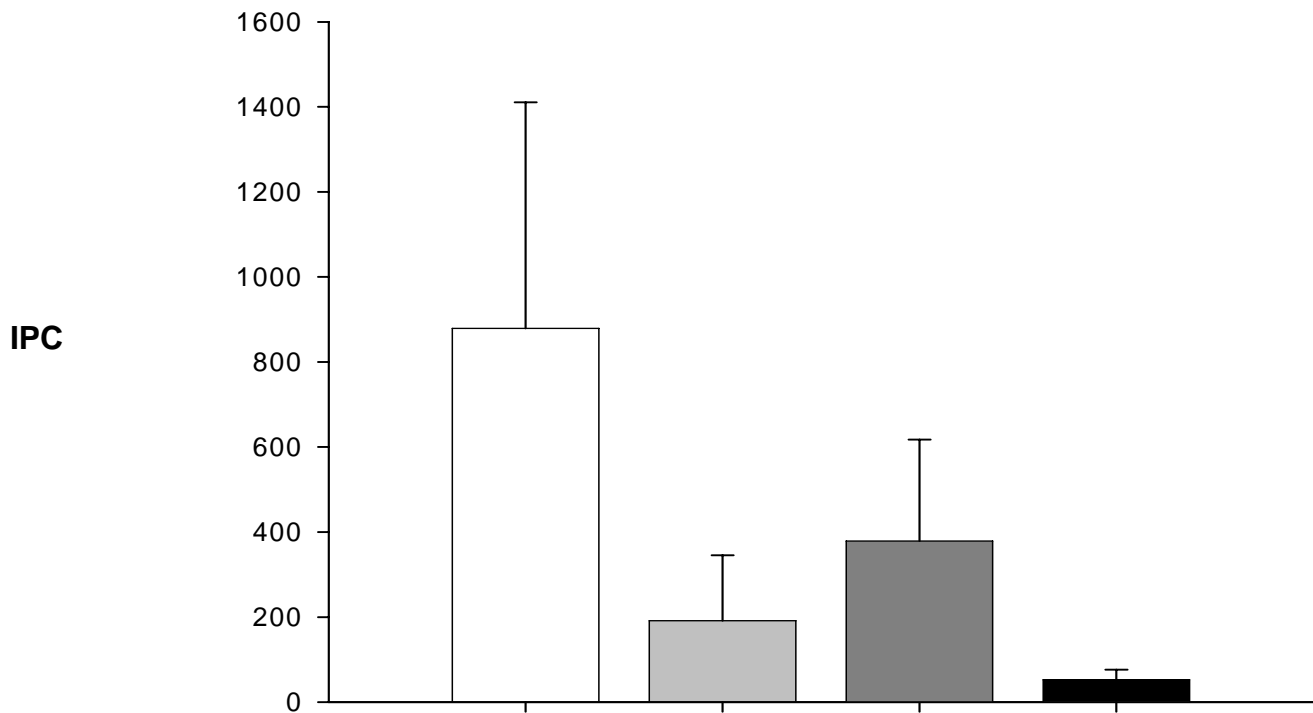


Figura 5. *Menor inhibición de la proliferación en pacientes con LEG.* Histogramas sobrepuestos de la proliferación en cultivos autólogos de controles (A) y pacientes (B) de células $CD4^+CD25^-$ estimuladas con anti-CD3 unido a la placa y anti-CD28 soluble después, en presencia (negro) y ausencia (gris) de células $CD4^+CD25^+$.

Con el fin de definir si la ausencia de supresión observada en las células de los pacientes con LEG era explicada por un defecto en la función supresora de las células Treg o por resistencia de las células efectoras a ser suprimidas, se realizó un cultivo alogénico. Se incubaron las células T efectoras obtenidas de los pacientes con LEG con las células Treg obtenidas de controles sanos y viceversa.

Contrario a lo esperado las células T efectoras derivadas de los pacientes con LEG fueron resistentes a la supresión inducida por las células Treg de los controles sanos, mientras que las células Treg obtenidas de los pacientes con LEG fueron capaces de suprimir casi por completo la proliferación de las células T efectoras de controles sanos demostrando una capacidad supresora intacta (Figura 6). La proliferación de las células T efectoras derivadas de los pacientes con LEG no fue inhibida ni por las células Treg autólogas (las obtenidas del mismo pacientes) ni por las células Treg alogénicas (obtenidas de un control sano).



Células efectoras	LEG	LEG	LEG	CTL
Células Treg	-	LEG	CTL	LEG

Figura 6. Las células T efectoras de los pacientes con LEG no son susceptibles a ser suprimidas por células Treg autólogas (barra gris claro) o alogénicas (barra gris oscuro); sin embargo, las células Treg de los pacientes suprimen la proliferación de las células T efectoras de los controles (barra negra).

Estos experimentos demuestran que la ausencia de supresión observada en los cocultivos de las células obtenidas de pacientes con LEG se explica por un defecto en las células T efectoras y no por alteraciones en la capacidad funcional de las células Treg.

Para evaluar la susceptibilidad de las células T activadas a ser suprimidas por las células Treg, estimulamos a las células T $CD4^+CD25^-$ en ausencia de células Treg y 72 horas después se agregaron células $CD4^+CD25^+$ recién obtenidas. No se observó un efecto negativo en la proliferación. Como la ausencia de supresión puede ser explicada por la falta de activación de las células Treg, se realizaron cocultivos con células T efectoras y reguladoras activadas por separado, que se agregaron 24 y 48 horas posteriores a la activación, tampoco se observó inhibición en la proliferación. (Figura 7)

Estos resultados pueden ser explicados por un defecto intrínseco de las células T efectoras o por la presencia de una proporción anormalmente alta de estas células *in vivo*.

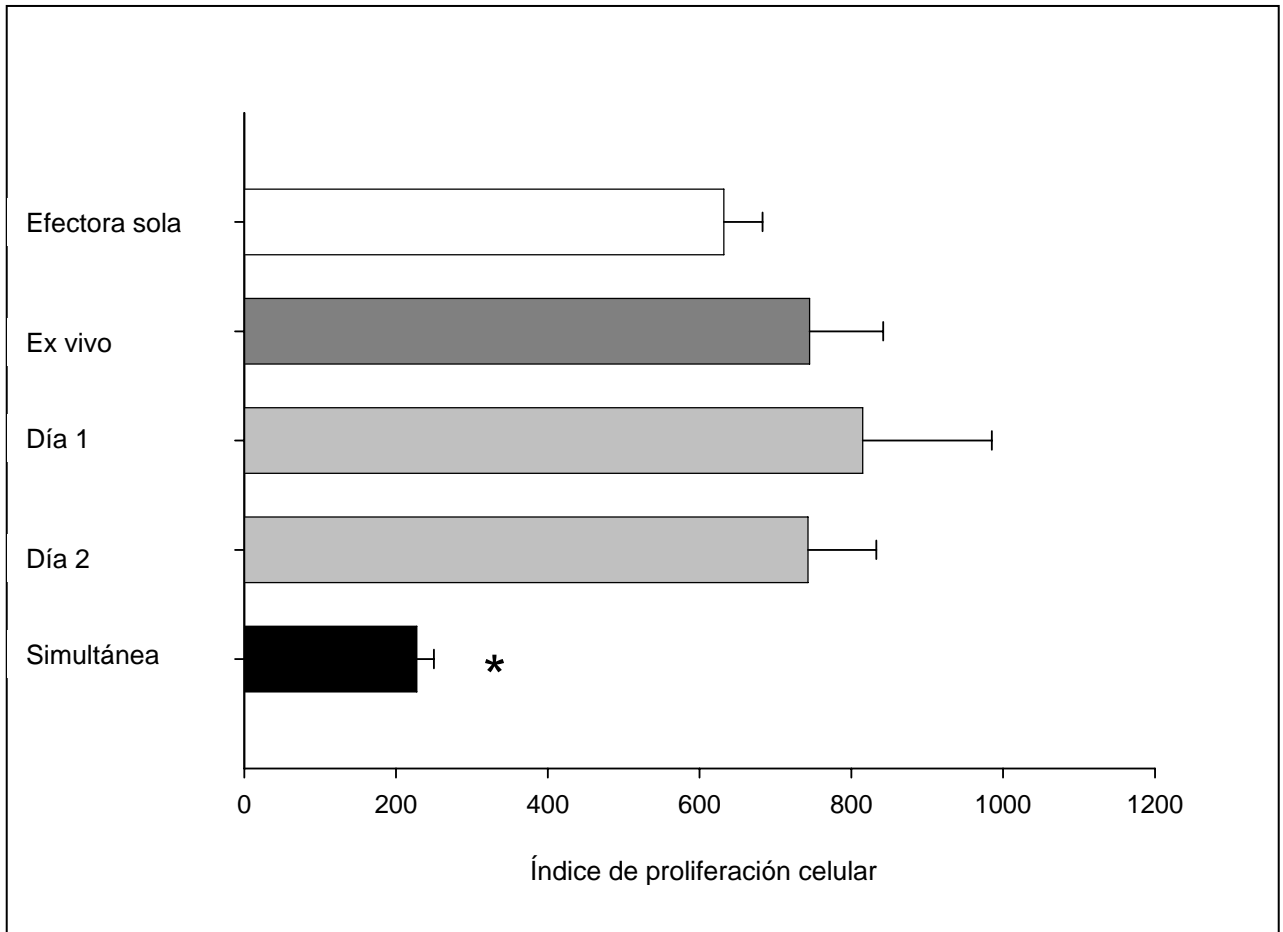


Figura 7. La supresión se observa solo cuando las células Treg son estimuladas junto con las células T efectoras (barra negra), no hubo supresión al agregar a los cultivos de células T efectoras, células Treg recién aisladas (barra gris oscuro) o a diferentes días de estímulo por separado (barra gris claro).

8. DISCUSIÓN.

Este trabajo muestra dos hallazgos principales, el número de células Treg, cuando son definidas como células FOXP3⁺, es normal en los pacientes con LEG y su capacidad reguladora está conservada.

La identificación fenotípica de las células Treg ha sido un tema complicado desde su descripción. A pesar de que el FOXP3 fue descrito como un factor de transcripción asociado específicamente con esta subpoblación celular ^{28 y 29}, el CD25 ha sido usado como un marcador de esta subpoblación ². Sin embargo no es el marcador mas adecuado debido a que las células T activadas sobre regulan su expresión. En el LEG este último hecho es aún más relevante, debido a que en es una enfermedad inflamatoria en la que se sabe que la frecuencia de células T activadas es anormalmente alta en sangre periférica ³⁰. Además, las células T obtenidas de pacientes con LEG presentan muchos defectos en sus procesos de activación que pueden interferir con la regulación de la expresión del CD25 ³¹. A pesar de esto existen trabajos, incluido uno de nuestro laboratorio, en los que han cuantificado las células CD4⁺CD25⁺ en pacientes con LEG ^{24 y 25}; esos resultados deben ser reinterpretados, ya que la única manera veraz de cuantificar células Treg es con la expresión de FOXP3.

El nivel de expresión de FOXP3, así como la producción de dos citocinas clave, la IL-2 y la IL-10, son normales en las células Treg de los pacientes sin embargo, a pesar de que el número y el fenotipo de las células Treg son normales

en pacientes con LEG no se observó una adecuada supresión en la proliferación de las células T autólogas. Los experimentos alogénicos, permitieron demostrar que las células Treg obtenidas de los pacientes con LEG son funcionales y que las células T efectoras de estos pacientes son menos susceptibles a la supresión por las células Treg. Un fenómeno similar ha sido descrito en los ratones MRL/Mp³³

En experimentos posteriores con células T normales se demostró que para que la supresión ocurra, las células T efectoras y reguladoras deben estar presentes en el momento de la estimulación. Cuando esto ocurre en momentos separados la regulación no ocurre. Este resultado demuestra que la ausencia de supresión observada en pacientes con LEG es causada por un estado de activación anormal de las células obtenidas de pacientes con enfermedad autoinmune. Estos resultados sugieren que los defectos en la función reguladora en las células T reportados en otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias deben ser reconsiderados³⁴⁻³⁷.

Los hallazgos de Ehremstein y colaboradores sostienen esta noción³⁴, ellos describen una alteración funcional en las células Treg de los pacientes con artritis reumatoide que persiste cuando los pacientes son tratados con medicamentos anti-TNF. Sus resultados son congruentes con los resultados presentados en este trabajo. Las células T activadas de forma anormal, encontradas en pacientes con enfermedad autoinmune, resisten la supresión. Aún más, nuestros resultados en células T de sujetos normales indican que la resistencia a la supresión es

probablemente un fenómeno natural asociado con la activación celular, necesaria para el desarrollo de una respuesta inmune fisiológica.

La resistencia a la supresión de las células T obtenidas de pacientes con LEG es multifactorial. Una relación anormalmente alta de células T activadas contra Treg sobrepasa la capacidad funcional de estas últimas. Sin embargo, a pesar de que la proporción de células T activadas es más alta en los pacientes con LEG que en los controles sanos, esta alcanza solo aproximadamente el 2% de las células T circulantes ³¹. Por otro lado, numerosos defectos que afectan los procesos de activación de las células T en los pacientes con LEG han sido reportados ³². Es posible que uno o más de estos defectos puedan hacer a la célula T menos susceptible para responder a la supresión inducida por células Treg. Ambos fenómenos interactúan y llevan a un círculo vicioso o a la participación de otras poblaciones celulares no estudiadas.

Algunos de nuestros resultados difieren de los publicados por Valencia y colaboradores ³⁸. Esta discordancia se explica por múltiples hechos, en primer lugar los pacientes estudiados son diferentes: en este trabajo se incluyeron solamente pacientes no tratados, mientras que Valencia incluyó pacientes con y sin tratamiento, en segundo lugar las poblaciones celulares usadas para los estudios *in vitro*, fueron también diferentes: ellos usaron citometría de flujo basada en cell sorting, mientras que nosotros optamos por aislamiento magnético. Aún así algunos de los resultados son congruentes. Por ejemplo se observó el mismo patrón en los cultivos *ex vivo* e *in vitro*.

En resumen no encontramos alteraciones cualitativas o cuantitativas en las células Treg de los pacientes con LEG; nuestros hallazgos sugieren que el defecto de la supresión de las células T observado en los pacientes con LEG es debido a resistencia en las células efectoras y no a una función reguladora anormal.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alarcón-Segovia D, Alcocer-Varela J, Diaz-Jouanen E. The connective tissue diseases as disorders of immune regulation. *Clin Rheum Dis* 1985; 11:452-469.
2. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-1164.
3. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18:723-737.
4. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T-cell subset. I evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance: deficit of a T-cell subset as possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med* 1985; 161:72-87.
5. Smith H, Lou YH, Lacy P, Tung KSK. Tolerance mechanism in experimental ovarian and gastric autoimmune disease. *J. Immunol* 1992; 149:2212-2218.

6. Powrie F, Mason D. OX-22 high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by OX-22 low subset. *J. Exp. Med* 1990; 172:1701-1708.
7. McKeever U, Mordes JP, Greiner DL, Appel MC, Rozing J, et al. Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:7618-7622.
8. Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T. And Shuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 2001; 193:1303-1310.
9. Jonuleit H., Schmitt E., Tuettenberg A., Knop J. And Enk A.H. Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 2001; 193:1285-1294.
10. Baecher-Allan C, Brown JA, Gordon J. Freeman and Hafler DA. CD4+CD25+ high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol* 2001; 167:1245-1253.
11. Danke N.A., Koelle D.M., Yee C., Behrrey S. And Kwok W.W. Autoreactive T cells in Healthy Individuals. *J. Immunol.* 2004; 172:5967-5972.

12. Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Lazzeri E., Manetti R., Vanini V., Romagnani P., Maggi E. and Romagnani S.. Phenotype, localization and mechanism suppression of CD4+CD25+ human thymocytes. *J. Exp. Med.* 2002; 196:379-387.
13. Viguiere M., Lemaître F., Verola O., Cho M.S, Gorochov G., Dubertret L., Bachelez H., Kourilsky P. and Ferradini L. FoxP3 expressing CD4+CD25^{high} regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the junction of infiltrating T cells. *J. Immunol.* 2004; .173:1444-1453.
14. Shevach EM. Certified professionals: CD4+CD25+ suppressor T cells. *J. Exp. Med* 2001; 193:41-46.
15. Powrie F, J. Carlino, M.W. Leach, S. Mauze and R.L Coffman. A critical role for transforming growth factor- β but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1- mediated colitis by CD45RB low CD4+ T cells. *J. Exp. Med* 1996;183:2669-2674.
16. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol* 2000; 18:423-449.
17. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their

common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev* 2001; 182:18-32.

18. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Iton M, et al. 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.

19. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F. CD38+CD45RB low CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *J. Immunol* 1998; 28:3435-3447.

20. Martín A, Kriegel, Tobias Lohmann, Cristoph Gabler, Norbert Blank, Joachim R. Kalden and Hanns-Martin Lorenz. Defective suppressor function of human CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J. Exp. Med* 2004; 199:1285-1291.

21. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22:531-562.

22. Dieckmann D., Braett C.H., Ploettner H., Lutz M.B. and Schuler G. Human CD4+CD25+ regulatory, contact dependent T cells induce interleukin 10-

- producing, contact-independent type 1-like regulatory T cell. *J. Exp. Med.* 2002; .196:247-253.
23. Piccirillo C.A. and Shevach E.M. Cutting edge: Control of CD8+ T cells activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol* 2001; 167:1137-1140.
24. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun* 2003; 3:273-276.
25. 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.
26. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Athrits Rheum* 1982; 25:1271-1277.
27. Guzmán J., Cardiel MH., Arce-Salinas A., Sánchez-Guerrero J., Alarcón-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J. Rheumatol.* 1992; 19:1551-1558.

28. Hori S., Nomura T. and Sakaguchi S. Control of regulatory T cells development by the transcription factor FoxP3. *Science* 2003; 299:1057-1061
29. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity* 2005; 22:329-341.
30. Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2003; 81:331-371.
31. Crispín JC, Martínez A, de Pablo P, Velasquillo C, Alcocer-Varela J. Participation of the CD69 Antigen in the T-Cell Activation Process of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand J Immunol* 1998; 48:196-200.
32. Kytтарыс VC, Tsokos GC. T lymphocytes in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:548-552.
33. Monk CR, Spachidou M, Rovis F, et al. MRL/Mp CD4+CD25- T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in vitro: a novel defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1180-1184.

34. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF alpha therapy. *J Exp Med* 2004; 200:277-285.
35. Kriegel MA, Lohman T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. Defective suppressor function of human CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 2004; 199:1285-1291.
36. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199:971-979.
37. Balandina A, Lécart S, Darteville P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005; 105:735-741.
38. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells function in patient with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2007; 178:2579-2588.



Immunoregulatory T cells in autoimmunity

Jose C. Crispin, Maria Ines Vargas, Jorge Alcocer-Varela*

Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México 14000, Tlalpan D. F. Mexico City, Mexico

Received 25 May 2003; accepted 25 June 2003

Abstract

The aim of this work was to discuss the current knowledge concerning regulatory T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. CD4⁺ T cells that constitutively express CD25 exhibit powerful suppressive properties. Such cells have been denominated regulatory T cells (T_R). Alterations in T_R cells are known to cause organ-specific autoimmune disease in animal models. These cells are anergic when stimulated via their TCR but proliferate when costimulated with IL-2. A particular characteristic is that CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit the proliferative responses of CD4⁺CD25⁻ T cells by suppressing the capacity of the responders to transcribe IL-2. The survival and/or expansion of this regulatory subset in the periphery appears to need the availability of IL-2, the components of the IL-2R, as well as cell surface costimulatory molecules. Cytokine participation has been shown in many of the *in vivo* models of autoimmunity where regulatory cells participate, providing evidence in favour of a role for IL-10, transforming growth factor- β and IL-4. The behavior and possible participation of regulatory T cells in human disease is still a poorly explored topic but their pathogenic role is warranted.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Autoimmunity; CD4⁺CD25⁺ T cells; Regulatory T cells

1. Introduction

It is widely accepted that the development of autoimmune disease involves a breakdown in the mechanisms that control T cell tolerance to self-antigens. During the last few years, much progress has been made in the understanding of processes that lead from a normal autoimmune state, in which no clinical manifestations exist, to an auto-

immune disease [1,2]. Autoreactive T cells are primary eliminated in the thymus by negative selection. However, some autoreactive T cells may escape thymic deletion and are released into the periphery. There is growing evidence that T cell anergy and T cell ignorance are the primary mechanisms that control this potentially harmful population. During the last 30 years, studies conducted in different experimental models have demonstrated the existence of a mechanism of immunosuppression in which a particular subset of cells prevents activation of autoreactive cells [3,4].

*Corresponding author. Tel.: +52-55-655-5954; fax: +52-55-573-2096.

E-mail address: jalcocee@sni.conacyt.mx
(J. Alcocer-Varela).

The peripheral mechanisms that ensure tolerance have been subject to extensive investigation in the last decades. Expressly, the existence of suppressive lymphocytes has been suspected and their identification has been broadly pursued [3]. Nevertheless, only recently has it been possible to recognize phenotypically a lymphoid population enriched in suppressive T cells [4]. These cells, known as regulatory T cells (T_R), are a naturally occurring $CD4^+CD25^+$ T cell subset that is anergic and suppressive. It is worth mentioning that not all $CD4^+CD25^+$ cells are suppressive; conversely, not all suppressive cells display the mentioned markers. CD25, the IL-2 receptor α chain, has been classically known as a lymphocyte activation marker; however, these cells express it constitutively. They are believed to be in a late stage of differentiation; this notion is supported by their expression of activation/memory markers ($CD45RB^{low}$ in rodents and $CD45RO$ in humans, $CD69$, $CTLA-4$) [5,6].

Depletion of $CD4^+CD25^+$ T cells has been shown to cause several organ-specific autoimmune diseases in animal models [7]. On the other hand, the reconstitution of this lymphoid subset prevents autoimmune disease in lymphopenia and day 3 neonatal thymectomy models [8]. It is currently unknown if this lymphoid subset has any participation whatsoever in human autoimmune disease.

The aim of this review is to discuss the current knowledge concerning regulatory T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases.

2. Regulatory T cells and immunoregulation

Immune response is kept under control and lymphocyte pools are maintained at constant levels through homeostatic processes. The mechanisms that control these thresholds are many and complex, and they integrate that we know as immunoregulation. Among the cells that might be responsible for this regulation, much attention has been focused, for more than three decades, on T cells. The concept of suppressor T cells emerged when it was shown that stimulation of the immune system by T-dependent antigens could give rise to the production of suppressor T cells that downregulate the differentiation of helper cells or antigen-

specific effector cells. Different studies have been carried out pretending to characterize the phenotype of suppressor T cells and their mechanism of action.

A general conclusion from these studies is that absence of the T-cell subsets that are depleted by thymectomy or by cell sorting using different markers allows the activation or the differentiation of autoreactive T cells into pathogenic T cells, which indicates that the depleted T-cell subsets might have a direct regulatory role. Other two alternative explanations should be considered: (a) the induction of an organ-specific autoimmune response developed in a immunosuppressed T-cell-depleted mice, through a viral or bacterial infection; (b) that T-cell proliferation, and perhaps activation, is stimulated by the lymphopaenic environment in which all of these experiments are carried out, through a homeostasis-driven mechanism involving recognition of self-peptide–MHC and also some cytokines, such as IL-2, IL-15 and IL-7 [9]. This last mechanism might be considered to models where immuno-reconstituted mice are used, which are more lymphopaenic than thymectomized mice. It has been shown that $CD25^+$ or $CD45RB^{low}$ T cells contribute efficiently to homeostasis to the extent that this contribution could mediate, at least in part, their regulatory function. It is interesting that at least one of the postulated mechanisms of homeostasis-driven proliferation is TCR-mediated recognition of self-peptides by autoreactive T cells. In this context, the possibility of competition for access to antigen-presenting cells (APCs) between regulatory T cells and pathogenic T cells should be considered. Supporting this are experiments with IL-2-deficient and $CD25^{-/-}$ mice who develop lymphoid hyperplasia and immune disorders. These abnormalities can be corrected by treatment with wild-type $CD25^+$ T cells in an IL-10-dependent manner. Data suggest that homeostasis-driven regulation explains, at least in part, the protection from allergic and autoimmune diseases that is provided by infections or other environmental factors, where immune responses are associated with intensive lymphocyte proliferation. It will be important to determine the regulatory T cells function in vivo under conditions

Table 1
Functional characteristics of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells

(a)	Do not proliferate in response to Ag stimulation
(b)	Suppress the activation and proliferation of other CD4 ⁺ or CD8 ⁺ T cells
(c)	Phenotype similar to memory or primed T cells
(d)	Inhibit IL-2 production by responder T lymphocytes and are unable to secrete IL-2
(e)	No dependency of CD28-mediated costimulation
(f)	Constitutive expression of CTLA-4 antigen
(g)	Upon activation, express membrane-bound tumor growth factor β (TGF- β)

that are not associated with lymphopaenia or infection-driven T-cell activation [9–12].

Availability of new in vitro model systems has facilitated analysis of the functional properties of the CD4⁺CD25⁺ subset. These characteristics are presented in Table 1. These cells are anergic when stimulated via their TCR but proliferate when costimulated with IL-2. A particular characteristic is that CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit the proliferative responses of CD4⁺CD25⁻ T cells by suppressing the capacity of the responders to transcribe IL-2. This inhibitory function requires stimulation of the T regulatory cells via their TCR and, in contrast to the in vivo studies, is mediated exclusively by a cell contact-dependent, cytokine-independent mechanism. After different stimuli, CD4⁺CD25⁺ T cells acquire nonspecific suppressor activity and this function is maintained in the absence of further stimulation via the TCR. As suppression is only observed upon activation of this regulatory T cells, this suggests that TCR activation induces the expression of a cell surface molecule that mediates suppressor function by

binding to its receptor constitutively expressed or induced on the responder cells by antigen stimulation. The requirements for the development and immune regulation of CD4⁺CD25⁺ T cells function in vivo are partially known. The survival and/or expansion of this regulatory subset in the periphery appears to need the availability of IL-2, the components of the IL-2R (CD25, CD122), as well as cell surface costimulatory molecules (CD80/CD86, CD28 and CD40) [11,12]. The evidence of participation of regulatory T cells in the maintenance of immunological self-tolerance is presented in Table 2.

3. Phenotypic identification of regulatory T cells

Suppressive T cells have always been there. Concealed within other lymphocytes, their presence has been revealed in functional assays [13]. Nevertheless, we have not been able to identify them phenotypically. A major step in this regard was the demonstration that regulatory T cells reside within a CD4⁺ subset that expresses CD25

Table 2
Evidence of participation of regulatory T cells in the maintenance of immunological self-tolerance

(a)	Neonatal thymectomy of mice leads to various autoimmune diseases: (1) gastritis (2) oophoritis/orchitis (3) thyroiditis (4) insulinitis
(b)	Depletion of peripheral T regulatory cells in normal naïve mice leads to similar autoimmune diseases.
(c)	Reconstituting immunodeficient nude mice with CD4 ⁺ T cells from normal mice previously depleted of TR cells induces similar diseases.
(d)	Restoration of nude mice with CD4 ⁺ T cells depleted of interleukin-2 receptor α -chain leads to the occurrence of the same polyautoimmune syndrome that is observed after day-3 thymectomy.
(e)	Athymic rats reconstituted with CD4 ⁺ T cells depleted of CD45RC ^{low} T cells develop inflammatory wasting disease. SCID mice reconstituted with CD45RB ^{hi} T cells develop colitis.

constitutively [14–17]. Unfortunately, not all suppressive T cells display CD25 and, more importantly, not all CD4⁺CD25⁺ T cells are regulatory. As expected, if a CD4 T lymphocyte is stimulated to express CD25 (i.e. if it is activated) it does not acquire regulatory activity by doing so [18]. Furthermore, evidence suggests that, in humans, regulatory T cells are more scanty in peripheral blood than in the mouse and only those which express high levels of CD25 exhibit suppressive activity in vitro (as opposed to CD4⁺CD25^{low} cells that do not) [19].

Besides CD25, the discriminating ability of other cell surface markers has been investigated. Thus, it is known that the regulatory T cell subset (defined as CD4⁺CD25⁺) constitutively expresses CTLA-4 and is enriched in cells that express activation/memory cell markers: HLA-DR and CD45RO (in humans), CD45RB^{low} (in rodents) and CD69 [18–21].

Using DNA microarray technique, McHugh et al. analyzed gene expression in resting and activated CD4⁺CD25⁺ T cells. They found that among other genes, CTLA-4, Galectin-1, CD103, Ly6, glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR/TNFRSF18), OX-40 (CD134/TNFRSF4) and 4-1BB (CDw137/TNFRSF9) were expressed in increased levels in the CD4⁺CD25⁺ T cells as compared to the CD25⁻ subset [6]. Among the CD4⁺CD25⁺ T cells, the CD103⁺ subset had a more efficient suppressive activity than its CD103⁻ counterpart. Analysis of the CD25⁺CD103⁺ cells revealed a phenotype of recently activated cells, showing higher levels of CD69 and lower levels of CD45RB and CD62L by flow cytometry than CD25⁺CD103⁻ T cells. Antibodies to CD103, CTLA-4, 4-1BB and OX-40 had no effect on the ability of the CD4⁺CD25⁺ cells to exert suppression. In contrast, a polyclonal goat antiserum to the mouse GITR extracellular domain was able to reverse suppression induced by freshly isolated CD4⁺CD25⁺ cells from normal BALB/c animals in response to anti-CD3. It was later shown in an in vivo model that anti-GITR is able to abrogate regulatory T cell activity and precipitate autoimmune disease in normal mice [22].

4. Regulatory T cells and cytokines

Regulatory cells expand their diversity due to a variable expression of phenotypic markers or to the production of cytokines by a limited number of T-cell subsets. Thus, there is a large overlap between the regulatory T-cell subsets, in terms of both phenotype and the cytokines involved. It is possible that some of these regulatory T-cell subsets are related developmentally or associated functionally and that their state of activation and/or the cytokines present in the environment have an influence on their inhibitory role. Again, the nature of the APCs involved must be considered as it has been suggested that selective TR1-cell generation follows antigen presentation by immature dendritic cells.

Cytokine participation has been shown in many of the in vivo models of autoimmunity where regulatory cells participate, providing evidence in favour of a role for cytokines in immune regulation. Different cytokines can downregulate both normal immune responses and autoimmune responses. Transforming growth factor- β (TGF- β), IL-10 and IL-4 are considered inhibitory molecules. TGF- β and IL-10 inhibit both TH1- and TH2-cell responses in vivo. IL-4 has been found to downregulate several TH1-cell-mediated autoimmune diseases. Meanwhile, interferon- γ inhibits TH2-cell responses. IL-10-deficient mice develop severe experimental encephalomyelitis, whereas transgenic mice that overexpress IL-10 are protected from disease development [4,11].

Treatment with cytokine-specific antibodies (i.e. IL-4, IL-10, TGF- β) prevents the induction of active tolerance after administration of soluble autoantigens or modified peptides. Tolerance induction after administration of autoAgs glutamic acid decarboxylase or myelin basic protein, is prevented by IL-4 or TGF- β antibodies, respectively. These two cytokines have been implicated in the protection against colitis that is observed after the reconstitution of SCID mice with CD45RB^{hi} T cells. In NOD mice, protection from diabetes observed after the transfer of CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ T cells from pre-diabetic mice is inhibited by TGF- β specific antibody (but not by IL-4-, IL-10-specific antibodies). The

administration of CD4⁺CD25⁺ T cells in adult thymectomized sub-lethally irradiated rats prevents the development of thyroiditis, and it is abrogated by IL-4- and TGF- β -specific antibodies. A role for TGF- β has been implicated in a wide variety of *in vivo* models suggesting that this cytokine is an important candidate for T-cell-mediated regulation. Whether TGF- β acts as a mediator of regulation or as a growth and/or differentiation factor for regulatory T cells is unknown. The immune-suppressive properties of IL-10 and TGF- β are most likely explained by the ability of these cytokines to inhibit APC function and to mediate direct anti-proliferative effects on T cells [6,19]. Indeed, one mechanism by which TR cells inhibit immune pathology may be by controlling the expansion of other T cell populations, via a process that requires IL-10 [9].

5. Regulatory T cells and antigen specificity

Antigen specificity of regulatory T cells is difficult to be tested. Some of the previously discussed models looking for TR1-cell-mediated suppression show that this effect is induced by the specific antigen that released the response. Taking into account the concept of bystander suppression, it has been shown that, in mice, an ovalbumin-specific TR1-cell clone protect them against colitis, which indicates that bystander suppression applies to T regulatory cells also. Data concerning of CD25⁺ T cells are still scanty. It has been postulated that the lack of exposure of immature T cells to the thyroid prevents their differentiation to regulatory T cells. The specificity of regulatory T cells in transplantation tolerance is still debated as these cells have been less well defined than in models of autoimmunity. There are relevant questions about T regulatory cells: (1) Which is the relationship between the naturally occurring CD25⁺ T cells that control the onset of autoimmunity and the antigen-specific regulatory CD25⁺ T cells that arise after sensitization in transplantation tolerance. (2) Selection of the regulatory cells takes place in the thymus or in the periphery. (3) The TCRs of CD25⁺ T cells are specific for the same antigens as recognized by effector T cells, or they have a totally unrelated

specificity for self-peptides that are expressed by the same APCs. (4) Thymic stroma is mandatory for the selection of these CD25⁺ T cells? [9,12].

6. Regulatory T cells and costimulation

Data on whether the cell contact-dependent inhibitory effects of TR cells are mediated via APCs are controversial. There is downregulation of the costimulatory molecules CD80 and CD86 on DCs and B cells when are cultivated with CD4⁺CD25⁺ T cells. Conversely, other authors have found that TR cells can inhibit responses induced by fixed APCs and that suppression occurs even when the antigens recognized by the TR cells and responder T cells are presented by different APC. T cell activation is inhibited by ligation of CTLA-4 on the surface of T cells and its ligands on APCs. Although different protocols using anti-CTLA-4 treatments inhibit the function of TR cells *in vitro*, others have found that *in vitro* suppression cannot be abrogated by blockade of CTLA-4. Experiments showing that CD4⁺CD25⁺ T cells from CTLA-4-deficient mice also exhibit some suppressive activity support this hypothesis. How CTLA-4 may be involved in the function of TR cells remains to be defined. There are two possibilities. First, it preferentially binds B7 molecules as a result of its higher affinity, thereby preventing CD28-mediated activation that might otherwise abrogate the suppressive function of TR cells. Second, cross-linking of CTLA-4 on activated T cells may induce inhibitory cytokines secretion. These findings show that TR cells may use multiple protective mechanisms to inhibit immune activation. At present, there is no easy way to put together all the evidence to delineate precise molecular pathways involved in suppression, but the relative roles of different suppressive mechanisms in protection from immune pathology *in vivo* may be highly dependent on the local environment of the target organ and also on the nature of the pathological immune response that must be inhibited. A distinctive feature of the CD25⁺ subpopulation is that its activation via the TCR fails to result in IL-2 production and proliferation, even in the presence of potent costimulatory signals such as agonistic anti-CD28. Using microarray

technology it has been shown that three members of the suppressors of cytokine signaling (SOCS) family, CIS, SOCS-1/JAB and SOCS-2, appeared to be more highly induced after activation of the CD25⁺ T cells. As IL-2 is required for the survival/maintenance of the CD25⁺ population, the SOCS proteins may be induced in response to this cytokine or other cytokines needed for the homeostatic control of these cells. Indeed, IL-2 induces the expression of SOCS-1, perhaps resulting in negative feedback in response to IL-2 through inhibition of STAT5. Elevated levels of SOCS expression may be required to carefully control the size of the CD25⁺ population in vivo to achieve a fine balance between the necessity to suppress autoreactivity and the ability to allow appropriate responses to foreign antigens. SOCS-1 has also been shown to bind to all four JAK kinases, therefore having additional inhibitory effects on multiple cytokines. In addition to STAT5, SOCS-1 is also a negative regulator of STAT3 and STAT6 activation and may play a role in regulating responses to IL-4 and IL-6 [12,22].

7. Regulatory T cells in human autoimmune disease

The behavior and possible participation of regulatory T cells in human disease is still a poorly explored topic. Patients with inherited thymic hypoplasia (DiGeorge syndrome) frequently develop autoimmune disease, but the mechanisms implied have not been studied [23]. Cao et al. measured and isolated CD4⁺CD25^{bright} cells in patients with rheumatoid arthritis (RA). Their quantity and functional properties were normal in peripheral blood when compared to normal subjects. Conversely, synovial fluid from patients with RA was enriched in regulatory T cells (median 7.1% of CD4⁺ T cells, range 1.8–20) [24]. We have quantified regulatory T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and found they are decreased during periods of disease activity. They are quantitatively normal during clinical remission [25].

Data regarding regulatory T cells are scarce and difficult to analyze. It is possible that their presence in the synovial joint in RA is part of a

counter-regulatory process. Likewise, their decrease in patients with SLE during disease activity is probably result of cell shifts into inflamed sites.

Acknowledgments

Supported in part by Conacyt (G34753-M).

Take-home messages

- CD4⁺CD25⁺ T cells exhibit powerful suppressive properties.
- Several experimental models of organ-specific autoimmune disease provide evidence that these T regulatory cells can inhibit harmful responses directed against self or foreign antigens.
- These cells are anergic, have a memory cells phenotype and express CTLA-4 antigen constitutively.
- Cytokines (IL-4, IL-10 and TGF- β) and costimulatory molecules have a key role in the homeostasis of the regulatory T cells.
- The possibility to induce or expand regulatory T cells could have important benefits in the study and treatment of autoimmune diseases.

References

- [1] Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *New Engl J Med* 2000;343:37–49.
- [2] Wicker L, Wekerle H. Autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1995;7:783–5.
- [3] Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18:723–37.
- [4] Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:423–49.
- [5] Taams LS, Smith J, Rustin MH, et al. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001;31:1122–31.
- [6] McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311–23.
- [7] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.

- [8] Asano M, Tada M, Sakaguchi N, et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996;184:387–96.
- [9] Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nature Rev Immunol* 2003;3:189–98.
- [10] Barthlott T, Kassiotis G, Stockinger B. T Cells regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med* 2003;197:451–60.
- [11] Maloy KJ, Salaun L, Chahill R, et al. CD4⁺CD25⁺ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003;197:111–9.
- [12] Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2:816–22.
- [13] Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969–80.
- [14] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.
- [15] Smith H, Lou Y-H, Lacy P, et al. Tolerance mechanism in experimental ovarian and gastric autoimmune diseases. *J Immunol* 1992;149:2212–8.
- [16] Malek TR, Yu A, Vincek V, et al. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rb deficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002;17:167–78.
- [17] Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287–96.
- [18] Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183–90.
- [19] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245–53.
- [20] Powrie F, Mason D. OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset. *J Exp Med* 1990;172:1701–8.
- [21] Takahashi T, Tagami T, Yamazaki T, 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.
- [22] Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135–42.
- [23] Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH. CD4⁺CD25⁺ T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1129–31.
- [24] Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003;33:215–23.
- [25] Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. CD4⁺CD25⁺ T cells are decreased in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmunity*, in press.

The World of Autoimmunity; Literature Synopsis

Chemokine stromal cell-derived factor 1 and murine lupus nephritis

Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) promotes the migration, proliferation, and survival of peritoneal B1a lymphocytes. These lymphocytes from NZB/W mice are exceedingly sensitive to SDF-1. This factor was produced constitutively in the spleen, peritoneal cavity and podocytes in the glomeruli. Balabanian et al. (*J Immunol* 2003;170:3392) demonstrate that administration of antagonists to SDF-1 or interleukin-10 early in life could prevent the development of autoantibodies, nephritis and death in NZB/W mice later in life. Furthermore, in mice with already established nephritis, this treatment inhibited autoantibody production, abolished proteinuria and immunoglobulin deposition, and reversed the morphological changes in the kidneys. This treatment counteracted peritoneal B1a lymphocytes expansion and T lymphocyte activation. These results support SDF-1 as an important factor in autoimmunity development in NZB/W mice model of lupus.

Lupus

<http://lup.sagepub.com>

Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance

MI Vargas-Rojas, JC Crispín, Y Richaud-Patin and J Alcocer-Varela

Lupus 2008; 17; 289

DOI: 10.1177/0961203307088307

The online version of this article can be found at:
<http://lup.sagepub.com/cgi/content/abstract/17/4/289>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

Additional services and information for *Lupus* can be found at:

Email Alerts: <http://lup.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://lup.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

Citations (this article cites 24 articles hosted on the SAGE Journals Online and HighWire Press platforms):
<http://lup.sagepub.com/cgi/content/refs/17/4/289>

PAPER

Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance

MI Vargas-Rojas, JC Crispín, Y Richaud-Patin and J Alcocer-Varela

Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Previous reports have suggested that regulatory T cells (Treg) are abnormal in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). In the present work, we quantified CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells in patients with SLE and found no quantitative alterations. However, we found a clear defect in suppression assays. Surprisingly, SLE-derived Treg cells exhibited a normal phenotype and functional capacity. Conversely, SLE-derived CD4⁺CD25⁻ effector T cells resisted suppression by autologous and allogeneic regulatory cells. Our findings strongly suggest that the defect in T-cell suppression observed in SLE is because of effector cell resistance and not because of an abnormal regulatory function. *Lupus* (2008) 17, 289–294.

Key words: regulatory T cells; suppression; systemic lupus erythematosus

Introduction

During the last years, several concepts have been modified in immunology. One of the most important changes has been the acknowledgement of the suppressive side of the immune response as a physiological and necessary element. Regulatory T cells (Treg) are probably the principal players of such suppressive arm.¹ They are selected in the thymus, probably because they contain a T-cell receptor that recognizes self-ligands with high affinity.^{2,3} When they are activated in the periphery, they limit the magnitude and duration of the response.⁴ FOXP3 is a transcription factor intimately linked to Treg cells.⁵ Its presence confers regulatory capacity to CD4⁺ T cells;⁶ its absence causes a severe autoimmune syndrome originated by the lack of Treg cells.⁷

The aforementioned facts have led to the study of Treg cells in several autoimmune diseases. Patients

with systemic lupus erythematosus (SLE), the prototypical systemic autoimmune disease, have been reported to have low numbers of Treg cells.^{8–11} Such determinations have been made, however, quantifying CD4⁺CD25^{high} T cells. Although this fraction of cells (CD4⁺CD25^{high}) has been shown to contain regulatory activity,¹² further work has proven that not all CD4⁺CD25^{high} cells are regulatory, indicating that CD25 is not the most adequate marker to quantify Treg cells.⁵

A second issue on the Treg cell quantification is if the number of Treg cells in a given disease has any meaning at all. Treg cells function – as effector cells – in determined spaces and times. Their number in peripheral blood is probably a poor indicator of their functional capability and represents a parameter difficult to interpret. Previous works have dealt with this fact and have assayed their functional capacity. Interestingly, suppressive function has been found altered in several autoimmune diseases, namely rheumatoid arthritis, autoimmune polyglandular syndrome, multiple sclerosis and myasthenia gravis.^{13–16} The defect in Treg-induced suppression has been suggested to contribute to the pathogenesis of these conditions. However, the basis of the suppression defect has not been identified. Furthermore, the fact that many, apparently unrelated, autoimmune diseases

Conflict of interest: No author has any potential conflicts of interest related to this work.

Correspondence to: Jorge Alcocer-Varela, Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico. Email: jalcocer@quetzal.innsz.mx

Received 26 October 2007; accepted 11 December 2007

share a Treg cell defect is in itself interesting, but suggests that it could be an epiphenomenon related to autoimmune conditions and not to a specific disease.

Treg cell function has been explored in patients with SLE. A previous work found that Treg cells were qualitatively normal but quantitatively deficient in these patients.¹⁰ They found that Treg cells from patients with SLE inhibited at least 95% of baseline proliferation and cytokine secretion. Likewise, Monk, *et al.*¹⁷ found that Treg cells from SLE-prone mice (MRL/Mp) were capable of suppressing T-cell proliferation of normal T cells but not of autologous T cells, probably because of resistance of MRL/Mp-derived T cells. In the present work, we report that Treg cells are indeed quantitatively and qualitatively normal in patients with SLE, and even though a suppression defect is conspicuous in such patients, it is because of resistance to suppression of abnormal SLE-derived T cells.

Patients and methods

Patients

Twenty patients with SLE diagnosed according to the revised classification criteria of the American College of Rheumatology¹⁸ were included. Of them, 10 patients were in clinical remission and 10 had clinical signs of disease activity at the time of the study. Clinical remission was defined as 1 year or more without any sign or symptom attributable to SLE and without any SLE treatment (including corticosteroids, immunosuppressive drugs and anti-malarials). Active patients were also treatment-free when the blood sample was drawn. Disease activity was measured with a validated clinical scale (MEX-SLEDAI).¹⁹ All active patients had arthritis, mucosal ulcers, leucopenia and increased DNA antibodies; three of them also had active renal disease, two with thrombocytopenia and two with vasculitis. Twenty healthy age- and sex-matched subjects volunteered as controls. General and clinical data of patients and controls is presented in Table 1. The study was approved by the Ethical

Table 1 Demographic characteristics of patients and controls

	Active	Remission	Controls
Number	10	10	20
Age (mean + SD)	29 ± 5.1	40.8 ± 14.5	34.7 ± 9.5
Gender (M/F)	1/9	0/10	1/19
Years since SLE diagnosis	1 ± 1.8	17.9 ± 6.6	—
MEX-SLEDAI	9.3 ± 22	0	—

Abbreviation: SLE: systemic lupus erythematosus.

Committee of our Institution. Participation was voluntary and all subjects signed a consent form.

Flow cytometry

Peripheral blood was conventionally stained (anti-CD4-FITC and anti-CD25-PE; BD Biosciences, San Diego, California, USA). For the measurement of cytokines (anti-IL-2-FICT, anti-IL-10-FITC; Diaclone, Besançon, France) and FOXP3 (anti-FOXP3-FITC; eBioscience, San Diego, California, USA) we performed intracellular staining. BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) was used for cell permeabilization.

Cell isolation and cultures

Peripheral blood mononuclear cells were obtained by gradient centrifugation on Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway). CD4⁺ T cells were isolated by magnetic depletion (CD4 T Cell Isolation Kit II; MicroBeads Miltenyi Biotec Inc., Auburn, California, USA). CD25⁺ and CD25⁻ subsets were obtained by magnetic isolation of labelled CD25⁺ cells (CD25 MicroBeads; Miltenyi Biotec Inc.). Cell cultures were performed in RPMI 1640 (GibcoBRL, Gaithersburg, Maryland, USA).

FOXP3 gene expression

Total cellular RNA was extracted from one million frozen CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ cells using the Trizol technique (Gibco-BRL, Scotland, UK). cDNA was obtained 2 µg of RNA (Monoley murine leukaemia virus reverse transcriptase, Gibco-BRL). FOXP3 cDNA amplification was performed in the presence of sense- and antisense-specific primers (5'-TCA AGC ACT GCC AGG CG-3' and 5'-CAG GAG CCC TTG GAT-3', respectively) at 30 pM each and two units of Taq DNA polymerase (Gibco-BRL). PCR using these primers yields a 100-bp amplicon.

Cell labelling with CFSE

Before incubation, cells were labelled with carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Biochemika, Fluka Chemie, Steinheim, Switzerland). Cell labelling was performed according to the instructions of the manufacturers.

Cell cultures and suppression assays

CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ cells were stimulated alone or in co-cultures (effector:Treg ratio 1:1). Cultures were set in triplicate. CFSE-labelled cells were

stimulated in 96-well plates coated with anti-CD3 (10 µg/mL, clone HIT3a) and soluble anti-CD28 (0.25 µg/mL, clone 28.2). Only the CD25-depleted effector population was CFSE-labelled. After 96 h of culture, cells were harvested and proliferation was analysed by flow cytometry.

Quantification of cell proliferation

Cell proliferation was measured according to CFSE dilution. To do so, the different cell generations were gated according to their CFSE levels. Gates setting was guided by the proliferation platform of the Flowjo software (version 7.2.2; Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA). The frequency of each generation was incorporated into an algorithm that assigns a different value to each population according to the times it has divided: $\sum Mn \cdot 2^{n-1}$, where Mn stands for the percentage of cells comprised within each gate, and n represents the gate being analysed. The result is expressed in arbitrary units (referred to as cell proliferation index, CPI). The CPI was validated in initial experiments. The results yielded by the formula correlated closely to the measurement of cell proliferation with [³H]-thymidine uptake ($R = 0.92$, $P < 0.0001$).

Statistical analyses

Descriptive values of variables were expressed as the mean \pm SEM. Variables with normal distribution were analysed by Student's *t*-test. Variables with non-normal distribution were analysed with the Mann-Whitney test. *P* values < 0.05 were considered significant.

Results

The number of CD4⁺CD25^{high} cells was significantly higher in normal individuals ($3.9 \pm 1.6\%$, mean \pm SD) when compared to patients with active ($1.4 \pm 1.0\%$, $P = 0.01$) and inactive SLE ($0.71 \pm 0.8\%$, $P < 0.01$). The percentage of CD4⁺FOXP3⁺ T cells was 3.2 ± 2.2 (mean \pm SD) in healthy controls and 2.8 ± 2.1 in patients with SLE.

A lower percentage of CD4⁺CD25^{high} cells expressed intracellular IL-2, when compared with CD4⁺CD25⁻ cells (16.9 ± 2.2 vs 71.2 ± 5.1 , respectively; $P < 0.001$). Conversely, no difference was observed in the proportion of CD4⁺CD25^{high} cells positive for intracellular IL-10 expression, when compared to CD4⁺CD25⁻ cells (26.1 ± 5.4 vs 38.3 ± 6.3 , respectively; $P = 0.10$). Furthermore, we found no differences in the expression of these cytokines when we

compared cells obtained from SLE patients with cells from normal volunteers [mean fluorescence intensity (MFI) IL-2 133.2 ± 34.6 vs 127.5 ± 29.8 and IL-10 95.3 ± 22.9 vs 84.6 ± 23.7 , respectively]. The intracellular expression of FOXP3 (quantified by MFI and the percentage of positive cells) did not vary between SLE-derived T cells and cells from healthy individuals (MFI 125.5 ± 28.7 vs 134.8 ± 26.9 , and $77.9 \pm 12.3\%$ vs $76.7 \pm 8.3\%$, respectively).

FOXP3 mRNA was detected only in the CD25⁺ cell fraction (data not shown). Hence, our method yielded a CD25⁻ subset (effector cells) devoid of Treg cells and a CD25⁺ subset enriched in Treg cells.

We stimulated effector and Treg cells, either alone or in an autologous co-culture (ratio 1:1). CD4⁺CD25⁺ cells from patients with SLE proliferated spontaneously and when stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 (CPI 100 ± 42 and 433 ± 73 , respectively). The difference between the proliferation of normal and SLE-derived regulatory cells was statistically significant ($P < 0.05$).

Effector T cells from patients with SLE showed increased spontaneous proliferation when compared with cells from normal subjects (379.2 ± 162 and 6.83 ± 5.0 , respectively; $P = 0.002$). As expected, normal cells proliferated vigorously when stimulated. Conversely, effector cells from patients with SLE exhibited an impaired response to the stimuli with anti-CD3 plus anti-CD28 (controls 1642 ± 186 , SLE 688 ± 182 ; $P < 0.001$).

Addition of Treg cells to cultures of stimulated effector cells greatly inhibited proliferation of the latter cell subset (77.3% of inhibition). However, this phenomenon was only observed with cells derived from healthy individuals. When co-cultures were prepared with cells obtained from patients with SLE, inhibition was not observed. The presence of Treg cells derived from patients with SLE did not make any difference in effector cell proliferation (alone 688 ± 182 vs co-culture 876 ± 340 , $P = 0.70$). These results are summarized in Figures 1 and 2. None of these alterations showed a correlation with disease activity or with any particular clinical characteristic.

As shown in Figure 3, Treg cells obtained from patients with SLE were able to suppress the proliferation of normal effector T cells almost completely, reporting an intact suppressive capacity. However, the proliferation of SLE-derived effector T cells was not inhibited neither by autologous Treg cells (obtained from the same patient) nor by allogeneic Treg cells (obtained from a healthy subject).

Finally, we stimulated CD4⁺CD25⁻ T cells in the absence of Treg cells, and added freshly obtained CD4⁺CD25⁺ cells 72 h later. No negative effect on

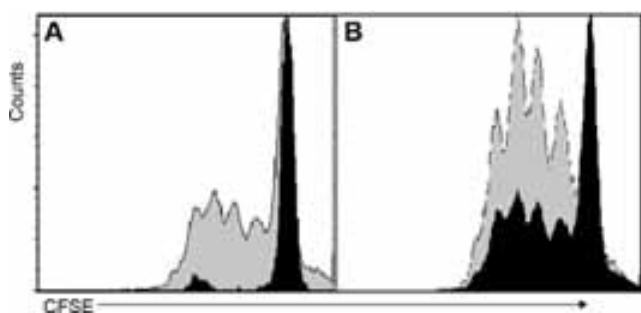


Figure 1 CD4⁺CD25⁺ T cells obtained from healthy subjects, but not from patients with systemic lupus erythematosus (SLE), inhibit CD4⁺ T-cell proliferation. Overlay histograms represent proliferation of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-labelled T cells stimulated in the absence (grey) and presence (black) of CD4⁺CD25⁺ autologous T cells. Cell proliferation results in less CFSE content per cell and in the presence of less-fluorescent cells. Representative experiments performed with cells obtained from a normal control (A) and with cells obtained from a patient with SLE (B) are shown.

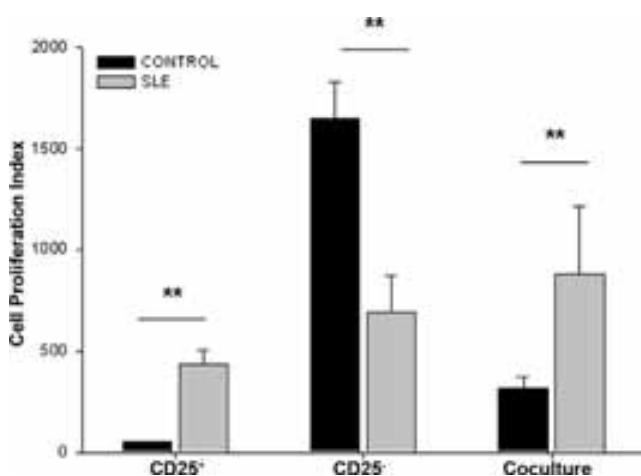


Figure 2 Cell proliferation and suppression in cells derived from patients and controls. Regulatory and effector T cells were incubated in the presence of plate-bound anti-CD3 and soluble anti-CD28. Cell proliferation was measured according to the cell proliferation index (in arbitrary units), according to carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dilution (for details, please refer to 'Methods'). Co-cultures were performed by adding Treg cells to cultures of CFSE-stained effector T cells in a 1:1 ratio. There were no differences between cells from active and inactive patients. Thus, they were considered together. ***P* < 0.01. Results are the mean ± SEM of 20 separate experiments.

proliferation was observed. Absence of suppression could have been explained by the lack of activation of Treg cells. Thus, we separately activated effector and Treg cells with anti-CD3 plus anti-CD28 and prepared co-cultures by combining independently activated cells (CD25⁻ and CD25⁺) 24 and 48 h postactivation. Once again, no suppression was observed (Figure 4).

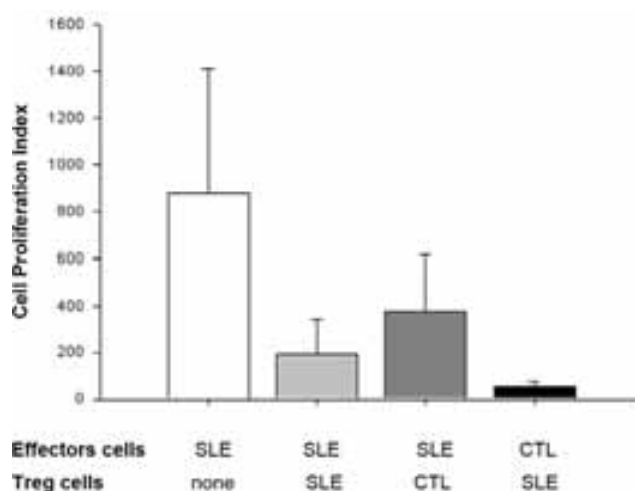


Figure 3 Effector T cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are not susceptible to suppression. SLE-derived effector T cells were stimulated (anti-CD3 plus anti-CD28) in the absence (white bar) or presence of autologous regulatory T cells (Treg) (gray bar), or allogeneic Treg cells obtained from a healthy individual (dark gray bar). Likewise, healthy effector T cells were stimulated in the presence of SLE-derived Treg cells (black bar). Results are the mean ± SEM of 10 separate experiments.

Discussion

The present work offers two major findings. We have quantified Treg cells and found that when defined as FOXP3⁺ cells, their numbers are normal in patients with SLE. Additionally, we have reported that their regulatory capacity is conserved but cannot be effectively enforced because of effector cell resistance.

The phenotypic identification of Treg cells has been a complicated issue since their first description. Until FOXP3 was described as a transcription factor specifically associated with this population,^{5,20} CD25, which they express constitutively, was used as a surrogate population marker.²¹ CD25, however, is not ideal because activated T cells up-regulate its expression. In the setting of SLE, the latter fact is even more relevant because SLE is an inflammatory disease in which abnormally high frequencies of activated T cells are known to be present in peripheral blood.²² Additionally, SLE-derived T cells exhibit conspicuous defects in their activation process that could interfere with the regulation of CD25 expression.²³ Thus, although several reports, including one from our lab, have quantified CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with SLE,⁸⁻¹¹ we presently believe their findings should be cautiously reinterpreted. We consider that the only manner of veraciously quantifying Treg cells relies on the expression of FOXP3; when we did, we found

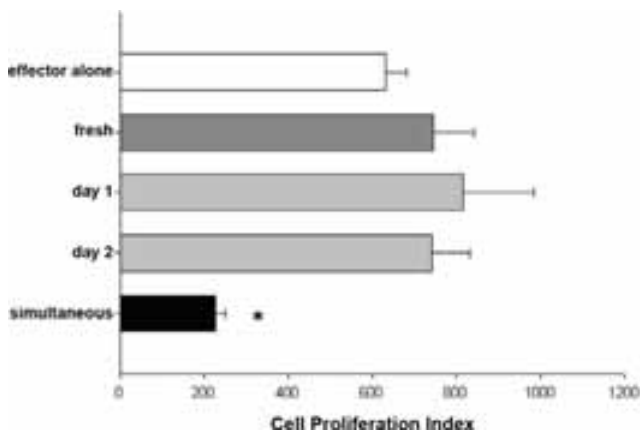


Figure 4 Suppression is only observed when regulatory T cells (Treg) are present during effector cell stimulation. Effector cells obtained from healthy individuals were stimulated (anti-CD3 plus anti-CD28) alone (white bar). Autologous Treg cells, either freshly obtained (dark gray bar) or stimulated in separate wells (gray bars), were added to the effector cells 1 or 2 days after the beginning of the culture. Suppression was only observed when both cell population (effector and regulatory) were stimulated in the same well since the beginning of the experiment (black bar). * $P < 0.01$, when compared to effector alone. Mean \pm SEM of five separate experiments.

no differences in regulatory cell numbers between healthy subjects and patients with SLE.

The level of expression of FOXP3, as well as the production of two key cytokines, IL-2 and IL-10, was normal in Treg cells from patients with SLE. Hence, even though numbers and phenotype of Treg cells were normal in patients with SLE, we did not observe adequate suppression of the proliferation of autologous T cells. Our allogeneic experiments allowed us to report that SLE-derived Treg cells were indeed functional and effector T cells from these patients are less susceptible to suppression by Treg cells. A similar phenomenon has been reported to occur in MRL/Mp mice.¹⁷ Furthermore, experiments performed in normal T cells showed that for suppression to occur, effector and Treg cells must be present at the time of T-cell stimulation. When this occurs in separate spaces, regulation does not ensue. Such result may suggest that the absence of suppression observed in patients with SLE is caused by the abnormal activation state of the cells that are obtained from autoimmune patients.

We believe that defects in Treg cell function reported in other autoimmune and inflammatory diseases should be cautiously considered.^{13–16} The findings of Ehrenstein, *et al.*¹³ support this notion. They described a functional alteration in Treg cells from patients with rheumatoid arthritis that subsides when the patients are treated with an anti-TNF agent. We believe that their results are congruent with the results

presented in our work. Abnormally activated T cells, found in patients with autoimmune diseases, resist suppression. Furthermore, our findings in T cells from normal subjects indicate that resistance to suppression is probably a natural phenomenon associated with cell activation, necessary for the development of a physiological immune response.

The resistance to suppression of SLE-derived T cells could be due to several factors. An abnormally high ratio of activated versus Treg cells could outweigh the functional capacity of Treg cells. However, even though the proportion of activated T cells is higher in patients with SLE than in normal subjects, it accounts for only ~2% of the circulating T cells.^{22,23} However, many defects have been reported to affect the activation process of SLE T cells.²⁴ It is possible that one or more of those defects could render the cell unresponsive to Treg cell-induced suppression. Both phenomena could interplay and lead to a vicious cycle. These issues must be dealt with in future work.

Some of our results differ from those published recently by Valencia, *et al.*²⁵ We believe that the discordance may be explained by several facts. In the first place, the studied patients are different; we included only untreated patients whereas Valencia enrolled treated and untreated patients. In the second place, the cell populations used for the in-vitro studies were also unlike: they used flow cytometry-based cell sorting, whereas we opted for magnetic isolation. Nonetheless, some of the results are congruent. For example, the same pattern in ex-vivo and in-vitro cultures was observed.

In summary, we found no quantitative or qualitative alteration in Treg cells from patients with SLE; our findings strongly suggest that the defect in T-cell suppression observed in SLE is because of effector cell resistance and not to an abnormal regulatory function.

Acknowledgements

This work was supported in part by a research grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 47950/A-1).

References

- 1 Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 531–562.
- 2 Picca, CC, Larkin, J, Boesteanu, A, Lerman, MA, Rankin, AL, Caton, AJ. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol Rev* 2006; **212**: 74–85.

- 3 Nishikawa, H, Kato, T, Tawara, I, et al. Definition of target antigens for naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; **201**: 681–686.
- 4 Shevach, EM. Certified professionals: CD4+CD25+ suppressor T cells. *J Exp Med* 2001; **193**: 41–46.
- 5 Fontenot, JD, Rasmussen, JP, Williams, LM, Dooley Farr, AG, Rudensky, AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity* 2005; **22**: 329–341.
- 6 Hori, S, Nomura, T, Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; **299**: 1057–1061.
- 7 Owen, CJ, Jennings, CE, Imrie, H, et al. Mutational analysis of the FOXP3 gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 6034–6039.
- 8 Crispin, JC, Martínez, A, Alcocer-Varela, J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmunity* 2003; **3**: 273–276.
- 9 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.
- 10 Miyara, M, Amoura, Z, Parizot, C, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005; **175**: 8392–8400.
- 11 Lee, JH, Wang, LC, Lin, YT, Yang, YH, Lin, DT, Chiang, BL. Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2006; **117**: 280–286.
- 12 Baecher-Allan, C, Brown, JA, Freeman, GJ, Hafler, DA. CD4+CD25+ high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; **167**: 1245–1253.
- 13 Ehrenstein, MR, Evans, JG, Singh, A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004; **200**: 277–285.
- 14 Krieger, MA, Lohman, T, Gabler, C, Blank, N, Kalden, JR, Lorenz, HM. Defective suppressor function of human CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 2004; **199**: 1285–1291.
- 15 Viglietta, V, Baecher-Allan, C, Weiner, HL, Hafler, DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; **199**: 971–979.
- 16 Balandina, A, Lécart, S, Dartevielle, P, Saoudi, A, Berrih-Aknin, S. Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005; **105**: 735–741.
- 17 Monk, CR, Spachidou, M, Rovis, F, et al. MRL/Mp CD4+CD25- T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in vitro: a novel defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 1180–1184.
- 18 Tan, EM, Cohen, AS, Fries, JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; **25**: 1271–1277.
- 19 Guzmán, J, Cardiel, MH, Arce-Salinas, A, Sánchez-Guerrero, J, Alarcón-Segovia, D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992; **19**: 1551–1558.
- 20 Hori, S, Takahashi, T, Sakaguchi, S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2003; **81**: 331–371.
- 21 Sakaguchi, S, Sakaguchi, N, Itoh, M, Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; **155**: 1151–1164.
- 22 Crispin, JC, Martínez, A, de Pablo, P, Velasquillo, C, Alcocer-Varela, J. Participation of the CD69 antigen in the T-Cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1998; **48**: 196–200.
- 23 Bonelli, M, von Dalwigk, K, Savitskaya, A, Smolen, JS, Scheinecker, C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis*, Aug 2007; doi: 10.1136/ard.2007.074690.
- 24 Kyttaris, VC, Tsokos, GC. T lymphocytes in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2004; **16**: 548–552.
- 25 Valencia, X, Yarboro, C, Illei, G, Lipsky, PE. Deficient CD4+CD25 high T regulatory cells function in patient with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2007; **178**: 2579–2588.