



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TH1, TH2,
TH17, TREG, Y DE LAS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN SANGRE
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOSANTE

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
LEONARDO LIMÓN CAMACHO

DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS LLORENTE PETERS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

COMITÉ TUTOR
DR. RUBÉN BURGOS VARGAS
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. DICIEMBRE DE 2012



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 084669).

Un agradecimiento especial a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIA

A Mané por su amor, su tiempo, su tenacidad, su apoyo moral y profesional, aportaciones invaluable para que mi proyecto se concretara.

A mi tutor, Doctor Luis Llorente Peters por su orientación y apertura.

Al comité tutor y a toda la gente que ayudó en la realización de mi doctorado,

mi agradecimiento.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	8
Linfocitos T CD4 ⁺	8
Células T Efectoras	9
Células T Reguladoras	12
Espondilitis Anquilosante	15
Agentes Bloqueadores del TNF- α	17
Infliximab	17
Etanercept	18
Modelos Animales	18
Citocinas	20
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
Objetivo General	22
Objetivo Específicos	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Pacientes	23
Obtención de Células Mononucleares	26
Caracterización Fenotípica de Células T CD4 ⁺ en Sangre Periférica por Citometría de Flujo	28
Cuantificación de IL-8 y citocinas en Suero por LUMINEX	29
Análisis Estadístico	30
RESULTADOS	31
Incremento en el Porcentaje de las Células Th1, Th17 y T reguladoras en Sangre Periférica de Pacientes con EA	31
Poblaciones Celulares en Pacientes Tratados con Bloqueadores del TNF- α	33
DISCUSIÓN	35
PERSPECTIVAS	38
REFERENCIAS	39
PREMIOS	49
ARTÍCULO	52

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la subpoblación de células T predominante en la espondilitis anquilosante (EA), para ello se caracterizaron las subpoblaciones celulares Th1, Th2, Th17 y Tregs en células periféricas mononucleares en sangre (PBMC) obtenidas de pacientes diagnosticados con dicha enfermedad. Se ha reportado previamente que en los PBMC de pacientes con EA hay un incremento en la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de células productoras de IL-17 posterior a la estimulación *in vitro* con anti-CD3/CD28 o con PMA/ ionomicina. Sin embargo, los estudios *in vitro* pudieran no reflejar el verdadero estado inmunológico del paciente, por lo que en este estudio analizamos los PBMC no estimulados. Se analizaron muestras de 46 pacientes con EA, incluyendo 7 (15.2%) que recibían tratamiento con inhibidores de TNF- α , 20 pacientes con artritis reumatoide y 25 controles sanos. El fenotipo de los linfocitos obtenidos se determinó por citometría de flujo y las poblaciones Th1, Th2, Th17 y Treg se definieron como CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺, CD3⁺CD4⁺IL-4⁺, CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺ y CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺, respectivamente. Nuestros resultados indican que los porcentajes de células Th17 y Th1 en pacientes con EA son más altos en comparación con los controles sanos (7.4% \pm 1.8% vs 0.7% \pm 0.2% y 4.0% \pm 1.3% vs 1.1% \pm 0.3%, respectivamente; $p < 0.0001$). En el caso de los pacientes en tratamiento con inhibidores de TNF- α los porcentajes de células Th17 y Th1 fueron más bajos en comparación con los controles sanos. Por otro lado, los niveles séricos de IL-6, IL-17A, TNF- α e IL-8 fueron significativamente más altos en los pacientes con EA en comparación con los controles. En el caso de los pacientes con EA en tratamiento con inhibidores de TNF- α , tanto el patrón de subpoblaciones celulares como el perfil de citocinas fueron similares a los observados en controles sanos. Nuestro estudio muestra por primera vez que la polarización de la respuesta inmune hacia Th17 ocurre en pacientes con EA y contribuye a explicar la naturaleza proinflamatoria de dicha enfermedad.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the Th1, Th2, Th17 and Treg subsets in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients previously diagnosed with ankylosing spondylitis (AS) in order to determine the predominant cell subset during the disease. It has been previously reported that PBMC from AS patients show an increase in the Th17 subpopulation and in tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion after *in vitro* stimulation with anti-CD3/CD28 or phorbol myristate acetate/ionomycin. However, *in vitro* stimulation might not reflect the true immunological condition of the patient. Therefore, nonstimulated PBMC were analyzed from 46 patients with AS, including 7 (15.2%) receiving TNF- α blockers, 20 patients with rheumatoid arthritis, and 25 healthy controls. The phenotype of freshly isolated PBMC was determined by flow cytometry and Th1, Th2, Th17, and Treg subsets were defined as CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺, CD3⁺CD4⁺IL-4⁺, CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺, and CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺, respectively. Our results indicate that the percentages of Th17 and Th1 cells in AS were higher than in healthy controls (7.4% \pm 1.8% vs 0.7% \pm 0.2% and 4.0% \pm 1.3% vs 1.1% \pm 0.3%, respectively; $p < 0.0001$). Th17 and Th1 cell subsets in patients treated with TNF- α blockers were lower than in those naive to such therapeutics and similar to healthy controls. Serum levels of IL-6, IL-17A, TNF- α , and IL-8 were significantly higher in patients with AS compared to controls. These T cell subsets and cytokine profiles of patients with AS treated with TNF- α blockers were similar to those of healthy controls. Our study demonstrates for the first time that the immune response polarization towards Th17 occurs indeed in patients with AS and further explains the proinflammatory nature of the disease.

1. Introducción

Las espondiloartritis (SpA) son un grupo heterogéneo de enfermedades autoinmunes que se caracterizan por la inflamación de la columna vertebral, las articulaciones axiales y en algunos casos, las periféricas, en forma de oligoartritis asimétrica de predominio en extremidades inferiores, que pueden cursar con compromiso extra articular (ocular, mucocutáneo, entesopatía, aortitis, etc.). La espondilitis anquilosante (EA) es el prototipo de este grupo de enfermedades ¹, y se define como una enfermedad reumática inflamatoria de evolución crónica que afecta de forma predominante al esqueleto axial, pelvis, columna vertebral y tórax. La afectación de las articulaciones sacroiliacas es constante y característica. También puede afectar a las articulaciones periféricas y algunos pacientes desarrollan manifestaciones extrarticulares ².

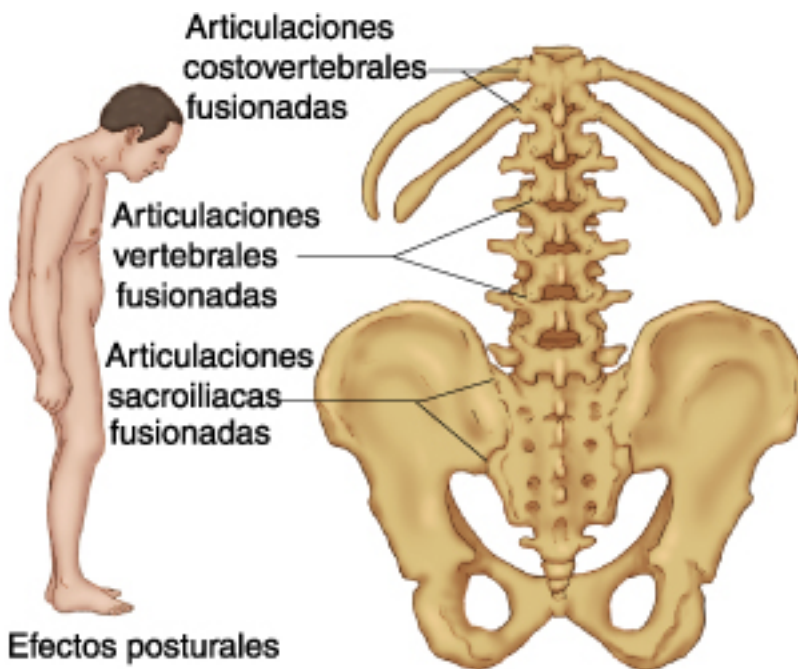


Figura 1: Cambios articulares secundarios a Espondilitis Anquilosante ².

Se desconoce la etiología de la EA, sin embargo, uno de los mecanismos propuestos para su desarrollo es el relacionado con los procesos infecciosos como el mimetismo molecular y la expansión clonal de células T efectoras autorreactivas después de una infección ^{3, 4}. La perpetuación de un microambiente rico en citocinas proinflamatorias favorece la generación de células T CD4⁺ caracterizadas por la producción de citocinas proinflamatorias, retroalimentando de esta forma el ciclo.

El balance entre las células T efectoras y reguladoras en la periferia, depende de muchas variables, como la concentración y el tipo de antígeno, el órgano blanco y las citocinas producidas tanto por las propias células T como por las células presentadoras de antígenos (CPA), las que a su vez, estimulan la secreción de citocinas por otras poblaciones celulares, creando un microambiente que modula la diferenciación celular y define el tipo de la respuesta inmune ⁵. Se ha descrito que los pacientes con EA tienen niveles incrementados del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el suero ⁶; esta citocina es un poderoso mediador proinflamatorio, capaz de producir inflamación a través de mecanismos directos e indirectos. La activación de los receptores del TNF- α induce la producción y liberación de un gran número de mediadores inflamatorios y muchos de estos, a su vez, inducen efectos inflamatorios adicionales que incluyen citocinas proinflamatorias, quimiocinas, proteasas y moléculas de adhesión ⁷. En modelos animales de artritis se ha demostrado que el uso de los bloqueadores del TNF- α , ya sea con la fracción del receptor soluble o con el anticuerpo monoclonal, resulta en una disminución en el número de las células Th1 y Th17 en las articulaciones,

lo que sugiere una vía común para la generación de ambas poblaciones celulares⁸.

Se sabe que el TNF- α participa en la diferenciación de las células dendríticas, las cuales a su vez son capaces de favorecer la diferenciación de las subpoblaciones de células T efectoras caracterizadas por la producción de citocinas proinflamatorias⁹, mientras que los bloqueadores de TNF- α previenen la maduración de las células dendríticas mieloides MHC-II⁺ y disminuyen el número de células T productoras de TNF- α , IFN- γ e IL-2^{10, 11}. La participación del TNF- α en la patogénesis de la EA ha sido demostrada con la mejoría clínica de los pacientes que usan bloqueadores de dicha citocina¹²⁻¹⁴. Estudios previos han reportado el papel de las células Th17 en la EA y en las SpA en general, de hecho, los sueros de los pacientes con EA tienen niveles incrementados de IL-17 y del TNF- α ^{6, 15}, y de las células Th17 en sangre periférica después de estimulación *in vitro*^{16, 17}. Sin embargo es importante determinar si esta polarización de la respuesta hacia Th17 es reflejo de lo que ocurre *in vivo* o únicamente el resultado de la estimulación *in vitro* ya sea con PMA/ionomicina o inclusive con anticuerpos anti CD3/CD28.

2. Marco teórico

2.1 Linfocitos T CD4⁺

Después de la activación, los linfocitos T proliferan, se diferencian y se denominan células T efectoras, caracterizándose por la producción de moléculas que cooperan para la eliminación del antígeno desencadenante del proceso de

diferenciación. Dependiendo de las características del antígeno, el resto de las células que participan en la respuesta inmune crearán un microambiente rico en citocinas que serán las que finalmente orquesten el tipo de respuesta y con ésta, la polarización de las células T efectoras ¹⁸.

2.1.2 Células T Efectoras

El paradigma Th1/Th2 descrito por Mosmann y Coffman ¹⁹ propone una regulación bidireccional de éstas dos subpoblaciones celulares mediante las citocinas características de cada una. Sin embargo, la reciente descripción de las células Th17 caracterizadas por la producción de IL-17 modificó el paradigma proporcionando una explicación complementaria al panorama descrito para las enfermedades autoinmunes ^{20, 21}.

La IL-17, también conocida como IL-17A, fue clonada por primera vez en 1995 ²². En los humanos el gen de IL-17 se localiza en el cromosoma 6p12 ²³. La IL-17 humana y murina presentan un 63% de homología ²⁴. Después de la descripción de esta nueva citocina se identificaron otras proteínas homólogas y actualmente se sabe que la IL-17 es una familia de 6 miembros que incluye desde la IL-17A hasta la IL-17F. Mientras que la A y la F son las que tienen mayor homología, la E es el miembro más divergente de la familia y es también conocida como IL-25 ²⁵. La activación vía el receptor de IL-17 (IL-17R) induce la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , quimiocinas como la IL-8 y metaloproteinasas de matriz. Si bien en 1995 se identificó por primera vez que la IL-17 era producida por células T CD4⁺ de memoria ²⁶, no fue hasta el 2005 cuando se les describió como un nuevo linaje de células T efectoras,

independiente de las clásicas Th1 y Th2: este nuevo subtipo de células T efectoras CD4⁺ se denominó células Th17 ^{20, 21}.

Las células Th17 se caracterizan por la capacidad de producir IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, expresan receptores para IL-23 y quimiocina tipo 6 ²⁷. La polarización de las células Th17 es guiada por señales de coestimulación y de citocinas dependientes del antígeno. Así como las células Th1, requieren de un medio enriquecido de IL-12 y señales que regulen la expresión del factor de transcripción T-bet, para su diferenciación; las células Th2 requieren para la polarización de la presencia de IL-4 y que las señales a través de STAT6 resulten en la expresión de GATA3 ²⁸; las células Th17 humanas dependen para su desarrollo de IL-1 β , IL-6 e IL-23 ^{29, 30} y la inducción de esta población celular requiere de señales a través de STAT3 ³¹ y la activación de los factores de transcripción ROR γ T y ROR α ³² (**Figura 2**).

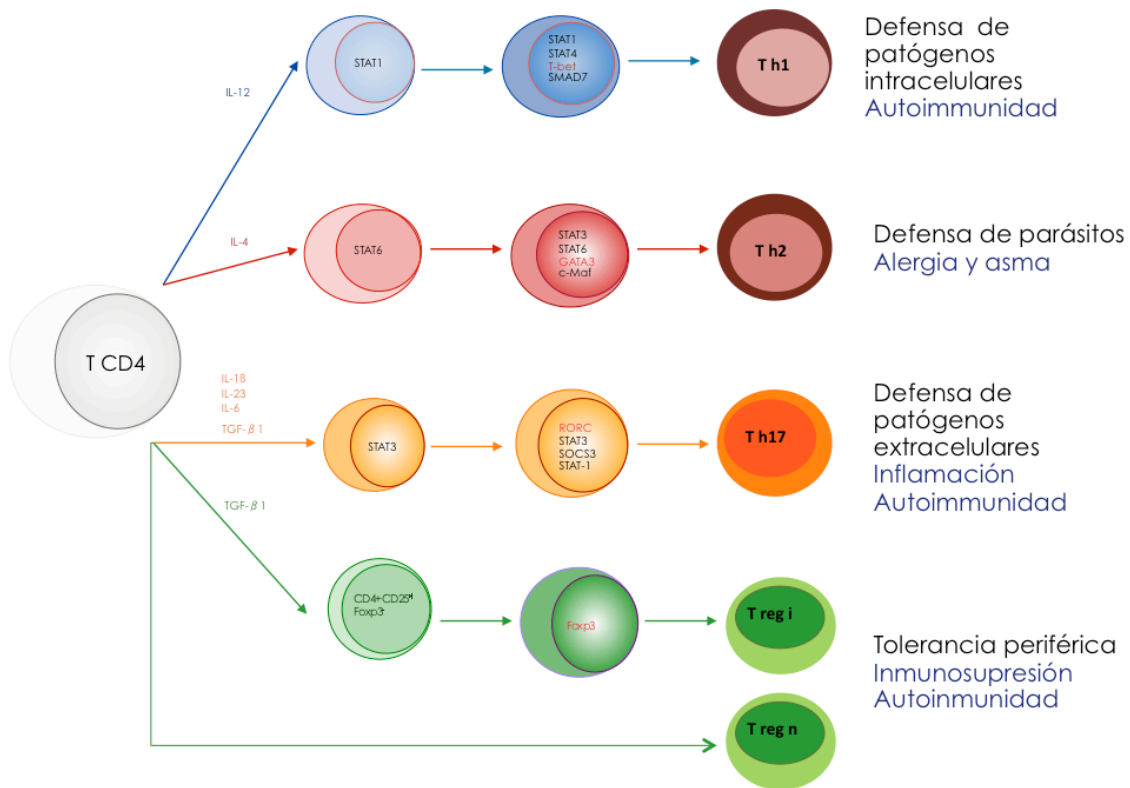


Figura 2: Citocinas y factores de Transcripción que participan en la diferenciación de las Células Th1, Th2, Th17 y Tregs.

Las células Th17 participan en la protección contra patógenos extracelulares. La producción de IL-17A e IL-17F en modelos infecciosos sugiere la participación de ambas citocinas en los mecanismos de respuesta inmune contra los microorganismos. La IL-17 aumenta la regulación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL1-β, TNF-α, MCP1 e IL-8³³, de factores de estimulación de colonias y recluta neutrófilos y células mieloides a los sitios de infección²³. A pesar de este papel protector, la respuesta mediada por esta población celular induce inflamación tisular grave y en algunas ocasiones la perpetuación de este proceso inflamatorio lleva al desarrollo de enfermedades

autoinmunes ³⁴. Se ha asociado a las células Th17 con las enfermedades autoinmunes, debido a la importancia de estas células en los modelos murinos de esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal y a la inflamación y daño tisular producido por las citocinas y quimiocinas proinflamatorias que las caracterizan ³⁵⁻³⁷.

2.1.3 Células T reguladoras

Por otro lado, el equilibrio de la respuesta inmunológica está en parte mediada por las células T reguladoras (Treg), cuyo descubrimiento se basó en la observación *in vivo*, de que los ratones timectomizados el tercer día de vida (d3Tx) desarrollan enfermedades autoinmunes, como fue revisado por Shevach ³⁸. Sakaguchi y colaboradores demostraron que la eliminación de las células Treg es la causa de las enfermedades autoinmunes en ratones d3Tx y que su transferencia las previene ^{39, 40}.

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. Durante los últimos diez 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, ya que esta subpoblación de células T expresa marcadores de activación y memoria que son comunes a los expresados por células T recién activadas como CD25, CTLA-4, GIRT y PD-L1 ⁴¹. Actualmente se utiliza el factor de transcripción Foxp3 como marcador.

La población de células Treg ha sido aislada del timo y sangre periférica de humanos ^{42, 43}, y 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 periférica⁴⁴. En humanos las células CD4⁺CD25⁺ con capacidad reguladora son aquéllas que tienen alta expresión de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25^{hi}) y el 95% de estas células tiene una expresión homogénea de CD45RO, CD62L, GIRT y CD122 ⁴⁴.

A partir del descubrimiento de la participación de FOXP3 en la función de células Treg ^{45, 45} y la observación previa en base a la descripción en 1982, del síndrome de inmunodeficiencia ligado al cromosoma X asociado a enfermedad autoinmune en órganos endocrinos (IPEX) ⁴⁶ y que este síndrome es similar al que desarrollan los ratones deficientes de FoxP3, se estableció una clara y directa correlación entre células Treg de animales y humanos. Posteriormente se reportó que las células Treg de humanos expresan FOXP3 ⁴⁷. Este factor de transcripción es un marcador molecular que no sólo confiere una característica fenotípica exclusiva a esta población, sino también determina su origen y función. Cabe aclarar que en las células T efectoras humanas activadas también expresan FOXP3 de manera transitoria ^{48, 49}.

Se han descrito dos tipos de células Treg, las naturales (nTreg) y las inducidas (iTregs). Las nTregs se originan en el timo, donde adquieren la expresión de FOXP3 y requieren para su mantenimiento y expansión en la periferia de TGF- β y de IL-2. Las iTregs pueden generarse en bazo, nódulos linfáticos, tejido inflamado y en el tejido linfoide asociado a intestino; se originan de células T CD4⁺ FOXP3⁻ o T convencionales que en condiciones de exposición crónica a ciertos antígenos ⁵⁰

y en presencia de TGF- β y ácido retinoico adquieren la expresión de FOXP3 y se vuelven supresoras⁵⁰⁻⁵². Algunos estudios indican que las iTregs comparten su repertorio de TCR con el de las células Tconv, lo que sugiere que las iTregs controlan respuestas contra antígenos externos y que las nTregs, dado su origen tímico, controlan la respuesta inmune contra autoantígenos^{50, 53}. Sin embargo, la especificidad de las Tregs es controversial, pues también hay reportes que indican que los TCRs de las nTregs reconocen principalmente antígenos externos^{54, 55}. Se ha reportado también que las nTregs expresan FOXP3 de manera más estable que las iTregs; esta diferencia se relaciona con modificaciones epigenéticas, ya que en las nTregs, dinucleótidos CpG en el locus de Foxp3 (en el promotor, en CNS2 y en TSDR) se encuentran desmetilados mientras que en iTregs generadas *in vitro* dichos motivos permanecen metilados⁵⁶. A pesar de las diferencias descritas entre estas dos poblaciones es importante señalar que determinar la importancia de las nTregs e iTregs durante procesos inmunológicos ha sido complicado debido a la falta de marcadores específicos que distingan a estas poblaciones.

Se ha demostrado que las células Treg tienen la capacidad de convertirse en Th1 y Th17, lo cual depende del microambiente en que se encuentran, es decir de las citocinas y de las células con las que interactúan⁵. También se ha reportado la existencia de Tregs “híbridas” es decir que coexpresan FoxP3 con factores de transcripción y citocinas característicos de otros linajes como ROR γ t/ IL-17 y T-bet/ INF- γ ; estas células mantienen sus propiedades supresoras *in vitro*, pero se desconoce su función *in vivo*^{57, 58}.

Los mecanismos de supresión de las células T se dividen en citocinas inhibitorias, dependientes de disrupción metabólica y dependientes de contacto ^{49, 59}.

Nos enfocaremos únicamente en el mecanismo supresor de las células Treg que involucra la producción de citocinas inhibitorias, como la IL-10, el TGF- β y la IL-35.

La IL-10 tiene la capacidad de inhibir la activación de células presentadoras de antígeno y de limitar la activación de células T. Esta citocina también actúa directamente en linfocitos inhibiendo tanto su proliferación como la producción de otras citocinas como IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-5. Además la IL-10 promueve la generación de células Tr1 que son células Foxp3⁻ con la capacidad de generar grandes cantidades de IL-10 ⁶⁰⁻⁶².

2.2 Espondilitis Anquilosante

Los procesos inflamatorios resultan esenciales para la defensa del huésped contra los microorganismos invasores y para eliminar los detritus de las zonas con daño y de esta forma favorecer la reparación tisular. Sin embargo, cuando este proceso inflamatorio persiste o no es regulado, puede provocar la destrucción de los tejidos del huésped como es el caso de algunas enfermedades autoinmunes como el lupus y la artritis reumatoide ⁶³.

La EA es considerada como el prototipo de las espondiloartritis. Ésta es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta las articulaciones vertebrales, particularmente las sacroiliacas, llevando a una fusión progresiva y ascendente de las vértebras. También puede producir inflamación de otras articulaciones como tobillos, muñecas y rodillas. Afecta más a hombres que a mujeres en una relación

3-4:1 con una prevalencia aproximada de 2 a 10 casos por 1000 habitantes. La enfermedad suele iniciar en la tercera década de la vida; tiene un inicio gradual con dolor e inflamación en la región lumbar y presenta erosiones del cartílago del hueso iliaco y posteriormente en el sacro reemplazando los bordes de la articulación erosionada por fibrocartílago que gradualmente se osifica hasta la desaparición de la articulación. La progresión en ascenso de este proceso lleva a la formación de la columna en “caña de bambú” característica de esta enfermedad, dando por resultado rigidez e inmovilidad en el paciente ².

Después de más de tres décadas del descubrimiento del HLA-B27 como el principal factor genético asociado a la enfermedad, contribuyendo en la susceptibilidad entre un 20 y un 40%, es claro que no es el único factor, ya que solo el 5% de la población con HLA-B27 desarrolla la enfermedad ⁶⁴.

Los hallazgos histopatológicos en esta enfermedad muestran un infiltrado con predominio de linfocitos T tanto en las articulaciones axiales (sacroiliacas) como las periféricas, con una mayor proporción de linfocitos CD4⁺, células NK y macrófagos CD68⁺, con fibroblastos en proliferación y con neovascularización ^{3, 4}, sobreexpresión de RNA mensajero de TNF- α y TGF- β ³, el hueso destruido es posteriormente remplazado y la osificación endocondral resulta en anquilosis ósea⁴ (**Figura 3**).



Figura 3: Radiografía en la que se pueden observar los sindesmofitos característicos de la enfermedad².

2.3 Agentes Bloqueadores del TNF- α

Hasta el momento el mejor tratamiento para esta enfermedad es el uso de los llamados “agentes biológicos” que han demostrado mejoría en el dolor, la inflamación y la función que inicia en el corto plazo pero que han demostrado tener una eficacia sostenida a lo largo del tiempo⁶⁵⁻⁶⁸.

2.3.1 Infliximab

El infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une de manera específica al TNF- α . Se administra por vía intravenosa y las dosis convencionales

para los pacientes con EA es de 5 mg/Kg cada 6 semanas. Uno de los estudios más grandes con este medicamento ha demostrado mejoras significativas en el dolor, la función y la actividad de la enfermedad en 279 pacientes con enfermedad activa comparados con placebo ⁶⁹. Después de 24 semanas el 61% de los pacientes tenían mejoría en las escalas de respuesta mientras que en el grupo placebo sólo el 19%. Es importante hacer notar que a pesar de la eficacia y seguridad del medicamento demostrado a largo plazo, hay una rápida pérdida de la respuesta después de la suspensión del tratamiento ⁷⁰ con recaídas de hasta el 60% a las 13.4 semanas ⁷⁰.

2.3.2 Etanercept

El etanercept es una proteína de fusión dimérica del receptor humano p75 TNF unida a una porción Fc de IgG1 humana, que se une e inactiva el TNF- α . Es administrada por vía subcutánea a una dosis de 25mg dos veces por semana y a diferencia del infliximab, éste también se une a otra citocina proinflamatoria, la linfotóxina- α ⁷¹ y ha demostrado su eficacia en el control de la actividad de la enfermedad en numerosos estudios cuando es comparado con placebo a las 12 semanas el 60% de los tratados contra el 23 % del grupo placebo ^{67, 72}.

2.3 Modelos Animales

El uso de modelos animales se centra en las ratas transgénicas HLA B27, debido a que los ratones transgénicos HLA B27 pueden desarrollar entesopatía que también puede ocurrir en los ratones silvestres ^{73, 74}. La primer evidencia de que el

HLA B27 juega un papel directo en la enfermedad, viene del modelo de ratas transgénicas donde la expresión de HLA B27 y de $h\beta 2m$ resultaba en inflamación del tracto gastrointestinal y de las articulaciones, con lesiones en piel y uñas semejantes a las vistas en psoriasis⁷⁵. Sin embargo, es importante aclarar que las ratas B27-Tg no proveen de un modelo exacto de la EA humana. Estos animales no desarrollan anquilosis del esqueleto axial y la afección intestinal es mucho más evidente que la que se ve clásicamente en los humanos con EA, a menos que tengan enfermedad inflamatoria intestinal como enfermedad coexistente.

En los modelos animales se ha demostrado que las células T son indispensables para el desarrollo de la enfermedad ya que las ratas nu/nu transgénicas para B27 permanecen libres de enfermedad⁶⁴. En este mismo modelo se observó que la transferencia de linfocitos T puede producir enfermedad inflamatoria intestinal siendo más eficientes los linfocitos $CD4^+$ que los $CD8^+$. Por otro lado se ha demostrado que al depletar la población de células $CD8^+$ no se evita el desarrollo de colitis o artritis⁷⁶, lo que sugiere una mayor participación de las células $CD4^+$ en el desarrollo de la enfermedad.

El infiltrado inflamatorio y los hallazgos descritos en modelos animales sugieren la participación importante de las células T $CD4^+$ en la iniciación y perpetuación de la inflamación en la EA y algunos grupos han intentado darle una participación a las poblaciones de células Th1 y Th2 analizando las citocinas en el suero y líquido sinovial de pacientes con EA. Sin embargo la evidencia disponible no permite diferenciar el tipo de respuesta que se da en esta enfermedad, lo que dificulta más el entendimiento y nos aleja de una mejor terapéutica⁶.

2.4 Citocinas

Los estudios que han evaluado la producción de citocinas en los pacientes con EA son pocos y controversiales. En éstos se han encontrado que las células T muestran una disminución en la producción de citocinas Th1. Rudwaleit y cols. han reportado una disminución de células T productoras de TNF- α e IFN- γ en este grupo de pacientes ⁷⁷. Más aún, después del tratamiento con agentes bloqueadores del TNF- α esta disminución de células Th1 puede disminuir o aumentar dependiendo del tratamiento ^{11, 12}. El uso de bloqueadores del TNF- α restaura las alteraciones en el perfil Th1 lo que sugiere que estas alteraciones de la función de las células T podrían ser secundarias a las anomalías en el balance de las citocinas derivadas de los macrófagos ⁷⁸. Por otra parte se ha reportado un aumento de IL-10 en el suero de pacientes con EA en relación a controles sanos, y este aumento no es dependiente de las células Th2 ⁷⁹ lo que sugiere la participación de otras poblaciones celulares en la producción de esa citocina antiinflamatoria.

Las citocinas tienen un papel muy importante en las alteraciones inmunológicas en las SpA en general. En la EA se producen tanto citocinas pro como antiinflamatorias y éstas dependen de la actividad de la enfermedad, de las células inflamatorias involucradas y de la localización de la inflamación. Sin embargo existe mucha controversia en los estudios publicados ^{11, 12} ya que es difícil hacer una determinación de las citocinas en el suero por la vida media corta de las mismas y los intentos de medirlas en líquido sinovial no aportan mucho al conocimiento. Por esto es importante definir el perfil de citocinas usando otro tipo de metodología, como la determinación de citocinas intracitoplásmicas, ya que no

sólo es importante conocer las citocinas involucradas en esta enfermedad sino también poder definir a las células productoras como Th1, Th2, Th17 y Treg en la fisiopatogenia de la EA, lo cual permitirá definir nuevas estrategias que permitan restablecer el balance de la respuesta inmune en este grupo de pacientes.

3. Justificación

Los reportes enfocados en el análisis de la respuesta inmunológica en pacientes con EA son controversiales y por lo tanto limitan los nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad.

Si bien los llamados “tratamientos biológicos”, que en el caso de la EA incluyen a los agentes bloqueadores del TNF- α , han sido el mayor avance terapéutico en los últimos años, no existen reportes de su efecto modulador de la respuesta inmunológica de los linfocitos CD4⁺.

Entre las subpoblaciones de células T efectoras definidas recientemente, las Th-17 han llamado particularmente la atención por su fuerte asociación con las enfermedades autoinmunes ³⁵⁻³⁷. Esto se debe al papel reportado de las células Th17 autorreactivas en los modelos murinos de esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal ⁸⁰⁻⁸⁴.

Es importante definir el tipo de respuesta celular (Th1, Th2 ó Th17) y la participación de otras poblaciones celulares como las células Treg en la fisiopatogenia de la EA, para poder diseñar estrategias que permitan restablecer el balance inmunológico en este grupo de pacientes.

4. Hipótesis

En pacientes con EA existe una polarización de la respuesta inmune a Th17, la cual esta asociada al desarrollo de la inflamación autoinmune característica de la enfermedad.

5. Objetivos

5.1 General

Caracterizar las subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2, Th17 y Tregs en la sangre periférica, así como el perfil de citocinas en los pacientes con EA para determinar las subpoblaciones predominantes de células T.

5.2 Específicos

1. Establecer la distribución fenotípica de las subpoblaciones de células T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 y Treg), en cultivos celulares obtenidos de sangre periférica de pacientes con EA tratados o sin tratar con bloqueadores de TNF- α , pacientes con artritis reumatoide (AR) y controles sanos.
2. Cuantificar los niveles de citocinas IL-6, IL-17A, IL-23, IFN- γ , TNF- α , VEGF y TGF- β , en el suero de pacientes con EA, AR y controles sanos.

6. Materiales y Métodos

6.1 Pacientes

Se estudiaron un total de 66 pacientes: 20 (15 hombres) con EA de acuerdo con los criterios modificados de Nueva York, (**Tabla 1**)⁸⁵. Los pacientes tenían una edad media de 38.3 ± 11.6 años; 19 (17 hombres) con EA juvenil (EAJ) con una edad media de 25.1 ± 10.1 años y 20 (5 hombres) con AR de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR)⁸⁶, con una edad media de 47.2 ± 13.8 años. Veinticinco individuos sanos (18 hombres), sin antecedentes de enfermedades autoinmunes con una edad media 32.2 ± 8.9 años, se incluyeron como controles. A todos los pacientes se les realizó al momento de la toma de la muestra valoraciones de actividad con puntuación de BASDAI para EA^{87, 88} o de DAS 28 para AR⁸⁹. Cincuenta y nueve pacientes recibían tratamiento farmacológico convencional con Fármacos Modificadores de la Enfermedad (FARME) y por lo menos un año previo al estudio sin la administración de agentes biológicos. Al momento de la toma de la muestra 2 pacientes con EA y 5 con EAJ recibían tratamiento con anti-TNF- α (seis con Infliximab y uno con Etanercept al menos durante un año previo a la toma de la muestra). Las características clínicas y demográficas de los pacientes se resumen en la **Tabla 2**. Este protocolo fue aprobado por el comité de ética del hospital y todos los pacientes y controles firmaron una hoja de consentimiento informado.

TABLA 1

Los Criterios Modificados de Nueva York (1984) Criterios de Clasificación de Espondilitis Anquilosante

A. Criterios Clínicos

-Dolor dorso-lumbar de al menos 3 meses de duración, que mejora con ejercicio y no con el reposo.

-Limitación en el movimiento de la columna lumbar (hacia los lados y hacia el frente)

-Disminución en la expansión de la caja torácica en relación a sus equivalentes por edad y sexo

B. Criterios Radiológicos

Bilateral sacroilitis grados 2-4 ó

Sacroilitis unilateral grado 3 ó 4

Se considera que un paciente tiene diagnóstico definitivo de espondilitis anquilosante si un criterio radiológico es asociado con al menos un criterio clínico.

Se considera que un paciente tiene diagnóstico probable de espondilitis anquilosante si están presentes tres criterios clínicos o uno radiológico sin ningún criterio clínico

Tabla 1 Criterios modificados de Nueva York ⁸⁵

Tabla 2 Características clínicas y demográficas de los pacientes

	Pacientes			
	Espondilitis Anquilosante n=46	Artritis Reumatoide n=20	Espondilitis Anquilosante con anti-TNF-α n=7	Controles sanos n=25
Género M/F	39/7	5/15	6/1	18/7
Edad				
Rango\pmDE	31.1 \pm 12.6	47.2 \pm 13.8	28.3 \pm 11	32.2 \pm 8.9
Edad de inicio				
Promedio\pmDE	15.4 \pm 6.1	42.5 \pm 12.3	12.6 \pm 5.7	-
BASDAI				
Promedio\pmDE	4.4 \pm 2.4	-	2.5 \pm 3.4	-
DAS28				
Promedio\pmDE	-	3.8 \pm 1.3	-	-

BASDAI = Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (rango 0–10); DAS28 = Disease Activity Score 28.

6.2 Obtención de células mononucleares

Se aislaron células mononucleares (CMN) de sangre periférica heparinizada a través de gradiente de densidad (Lymphoprep Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega). Brevemente, se obtuvo una muestra de 20 mL de sangre periférica por punción venosa con el sistema Vacutainer en tubos con heparina. Las muestras se centrifugaron 1000Xg durante 30 minutos a 17 °C. Se recolectó el anillo de células en un tubo estéril de poliestireno de 15 mL, y se realizaron dos lavados con solución amortiguador de fosfatos salino (PBS) estéril centrifugando a 1000Xg durante 10 minutos; se descartó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular para determinar la viabilidad con azul tripano al 0.4% y se efectuó la cuenta celular en cámara de Neubauer para ajustar a 1×10^6 células /mL.

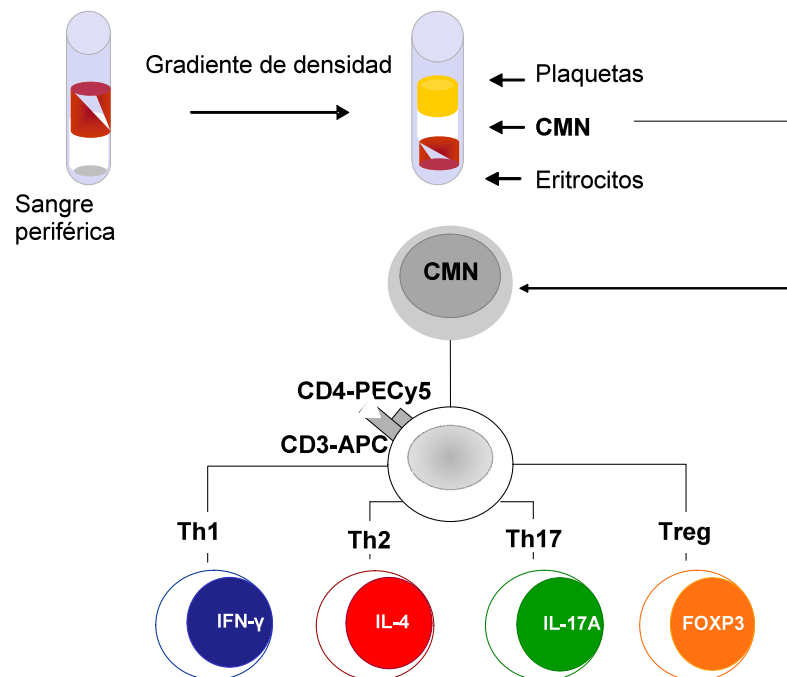


Figura 4: Obtención de células mononucleares a través de gradiente de densidad y caracterización fenotípica de células TCD4⁺.

Caracterización fenotípica de células T CD4⁺

Para la cuantificación de las subpoblaciones de células T, las células se marcaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD3-APC y anti-CD4-Cy5 de Beckton Dickinson (BD Biosciences, San Diego, CA). 4×10^6 de CMN se incubaron con al combinación correspondiente de anticuerpos durante 30 minutos (4°C, oscuridad). Posteriormente se lavaron dos veces (1000 g 5 minutos) y se resuspendieron en paraformaldehído 1% para ser analizadas en el citómetro de flujo. Las tinciones intracelulares se realizaron utilizando las soluciones Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del proveedor. El análisis se realizó en el citómetro FACSAria utilizando el programa FACSdiva (BD Biosciences), capturando 50 000 eventos de la población linfoide seleccionada de acuerdo a sus características de tamaño y granularidad. Para las tinciones intracitoplásmicas se usaron anticuerpos anti-IFN γ -APCCy7, anti-IL4-PE, anti-IL-17A-PE (BD) y anti-FOXP3-FITC (BD Biosciences) (**Figuras 5**).

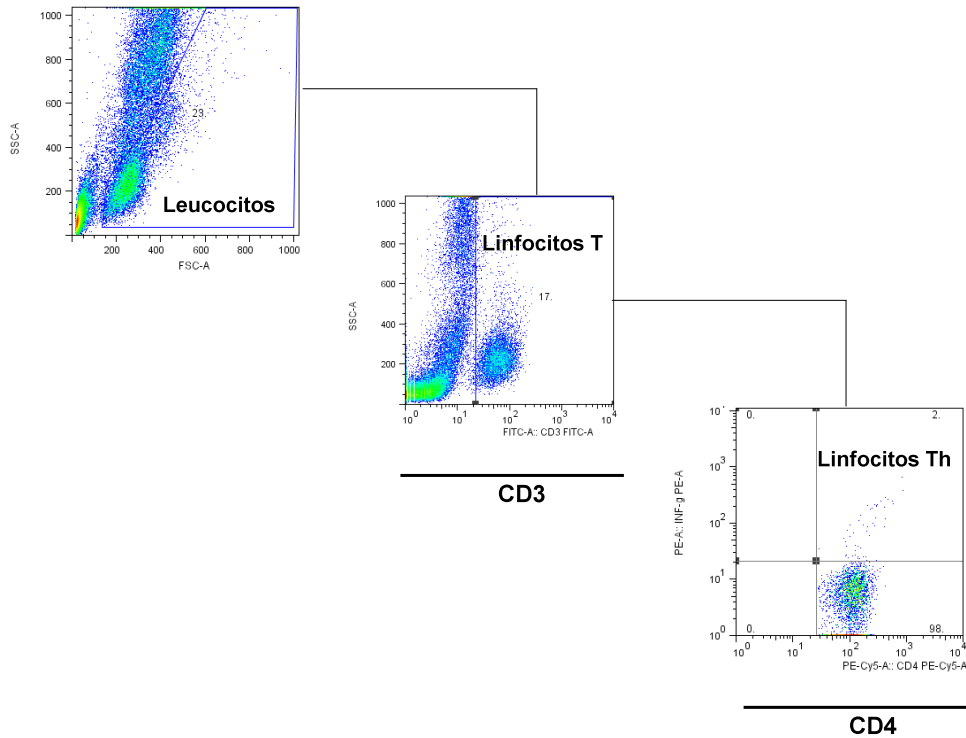


Figura 5: Análisis de linfocitos CD4 efectores. Los leucocitos fueron seleccionados acorde a sus características de tamaño y granularidad. Posteriormente se seleccionaron los linfocitos T por su expresión de CD3. Finalmente la población CD3+ CD4+ (linfocitos Th), se analizó en función de cada una de las citocinas de interés.

6.3 Cuantificación de IL-8 y citocinas en suero

Las concentraciones séricas de IL-6, IL-12, IL-17A, IFN- γ , TNF- α e IL-8 fueron determinadas por tecnología LUMINEX de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). El límite de detección para el sistema fue 2.6, 3.5, 3.3, 6.4, 6.0 y 1.0 pg/ml, respectivamente y los resultados fueron analizados usando el programa Bio-Plex versión 4.1.

6.4 Análisis estadístico

Las variables continuas fueron expresadas como mediana \pm la desviación estándar. Las variables binomiales fueron expresadas como frecuencia y porcentajes. Se usó Chi cuadrada, ANOVA y t de student para las comparaciones entre grupos. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizó el Programa Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS por sus siglas en inglés) versión 16 para el análisis.

7. Resultados

7.1 Incremento en el porcentaje de las células Th1, Th17 y Treg en sangre periférica de pacientes con EA.

Se realizaron incubaciones con anticuerpos contra moléculas de superficie e intracitoplásmicas para determinar en una muestra de células mononucleadas recién aisladas el porcentaje de células Th1 (CD3⁺, CD4⁺ e IFN γ ⁺), Th2 (CD3⁺, CD4⁺ e IL-4⁺), Th17 (CD3⁺, CD4⁺ e IL-17A⁺) y Treg (CD3⁺, CD4⁺ y FOXP3⁺) y los datos se analizaron como se indica en la **Figuras 5-7**.

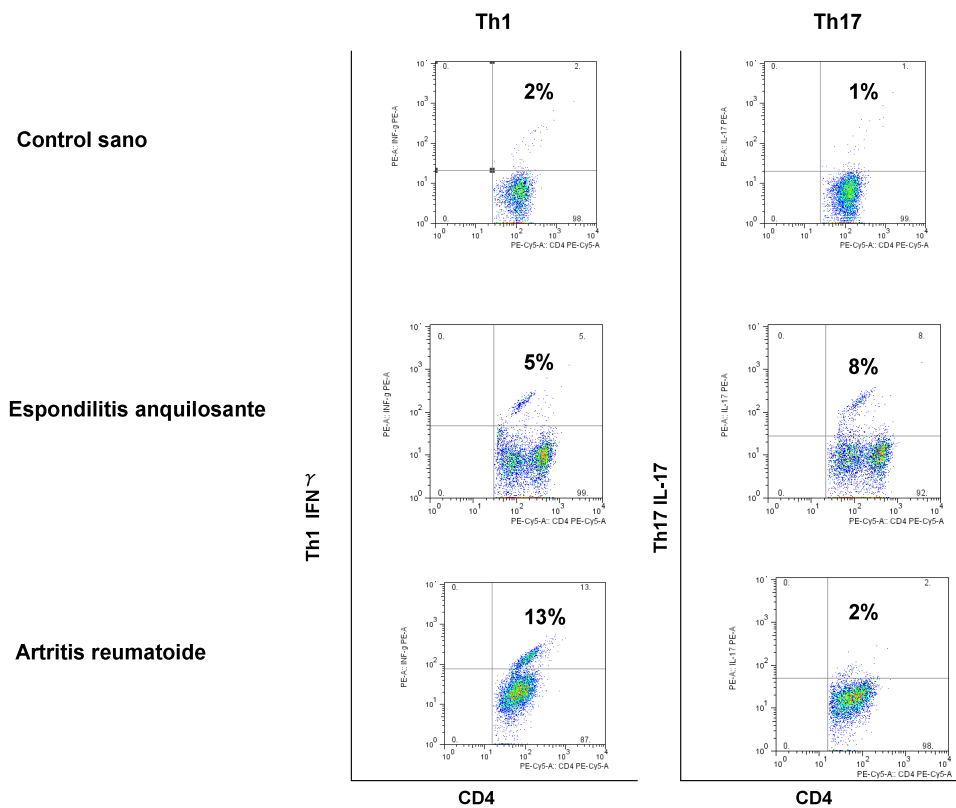


Figura 6. Ejemplos representativos de las subpoblaciones analizadas por citometría de flujo. Dot Plot de las subpoblaciones de células Th1 y Th17 a partir de la ventana de células CD3⁺ CD4⁺ de controles sanos, pacientes con espondilitis anquilosante, y artritis reumatoide.

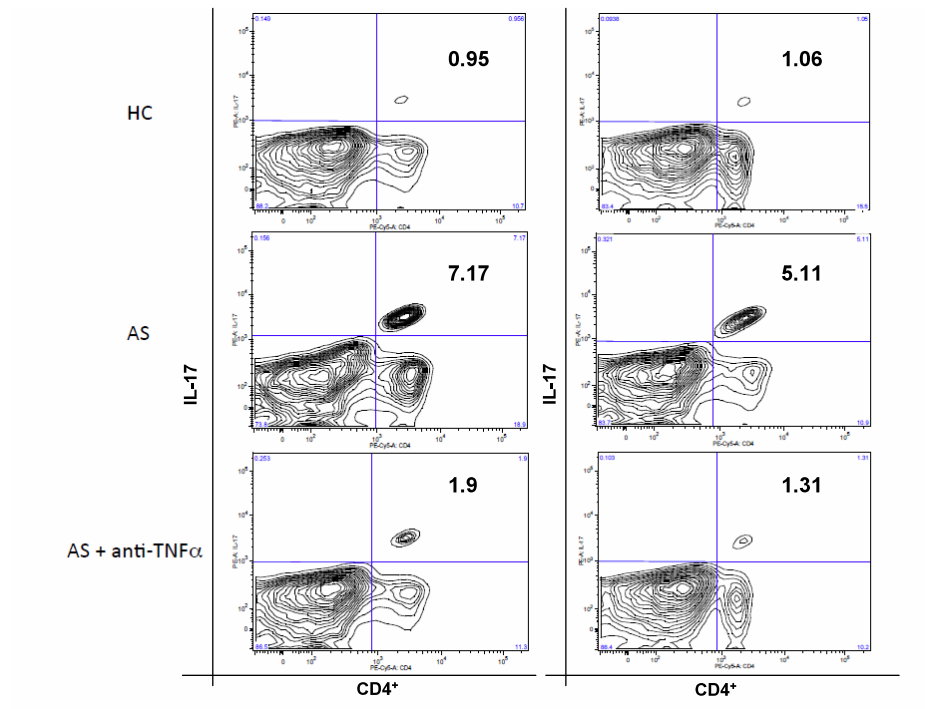


Figura 7. Análisis por citometría de flujo de la subpoblación Th17. Las subpoblaciones de células T productoras de IL-17 a partir de la ventana de células CD3⁺CD4⁺ de controles sanos (HC), pacientes con espondilitis anquilosante (AS), y pacientes con espondilitis anquilosante en tratamiento con agentes bloqueadores del factor de necrosis tumoral alfa.

En la **Figura 8** se observa que el porcentaje de células Th17 fue significativamente más alto en pacientes con EA en relación con los pacientes con AR y con los controles sanos ($7.4\% \pm 2.4$ vs $1.4\% \pm 1.1$, $p < 0.001$ y $0.7\% \pm 0.2$, $p < 0.001$ respectivamente); no hubo diferencia en el porcentaje de células Th17 de pacientes con AR y controles sanos. Sin embargo, se encontró un incremento en el porcentaje de la población Th1 tanto en pacientes con EA ($4.2\% \pm 1.1$) como en pacientes con AR ($4.3\% \pm 2.4$) con respecto a los controles sanos ($1.1\% \pm 0.3$ $p < 0.001$). Con estos resultados se demuestra un aumento cuantitativo en la población de células Th17 en la sangre periférica de los pacientes con EA mientras que la población Th1 se encuentra elevada en ambas enfermedades

inflamatorias con porcentajes similares (EA $3.9 \pm 2.1\%$; AR 4.3 ± 2.4 vs Controles sanos 1.1 ± 0.3). En la misma figura, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células Th2 en los tres grupos estudiados (EA 2.1 ± 1.1 , AR 1.6 ± 0.5 $p=0.48$ y controles sanos 1 ± 0.4 $p=0.08$). Finalmente, el análisis del porcentaje de células Treg FOXP3⁺, mostró que hay un incremento y éste se encontró elevado en los pacientes con EA en relación con los controles sanos (7.5 ± 3.5 vs 5.3 ± 1.7 $p=0.004$), pero no en comparación con los de AR.

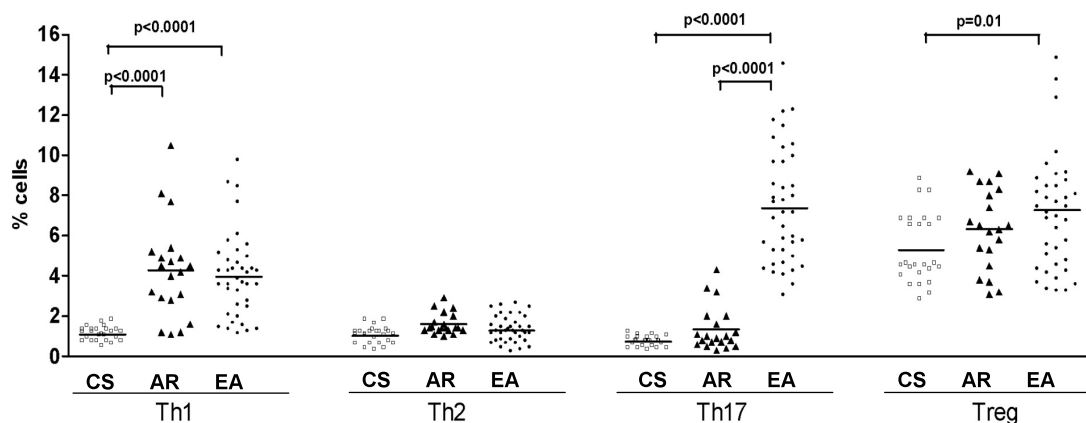


Figura 8. Porcentaje de las superpoblaciones celulares en sangre periférica en condiciones libres de estímulo *ex vivo*. Controles sanos (CS), pacientes con artritis reumatoide (AR) y pacientes con espondilitis anquilosante (EA). Donde Th1 se tiñó con anti-IFN- γ -APC-Cy7, Th2 con anti-IL-4-PE, Th17 con anti-IL-17A-PE (BD) y Tregs con anti-FOXP3-FITC.

7.2 Poblaciones celulares en pacientes tratados con bloqueadores del TNF- α .

Con el objetivo de evaluar la modulación de los agentes biológicos sobre las subpoblaciones celulares evaluamos a los pacientes que recibían este tratamiento. Siete pacientes con EA recibían tratamiento con agentes biológicos 6 de ellos con Infliximab y uno con Etanercept. La **figura 6** muestra que en el

porcentaje de las subpoblaciones de células T CD4⁺ se encontró una disminución en las células Th17 comparadas con los pacientes con EA que sólo recibían tratamiento con FARMES, (0.9% ± 0.5 vs 7.4% ± 2.4 p <0.001) y porcentajes similares a los de los controles sanos (0.7% ± 0.2 p=0.25). Asimismo, se observó un patrón similar de disminución en el porcentaje de las células Th1 (EA con biológico 0.4% ± 0.2 y controles sanos 1.1% ± 0.3 p=0.06) y en las células Treg (EA con biológico 7 ± 2.1 y controles sanos 5.3 ± 1.7 p=0.15).

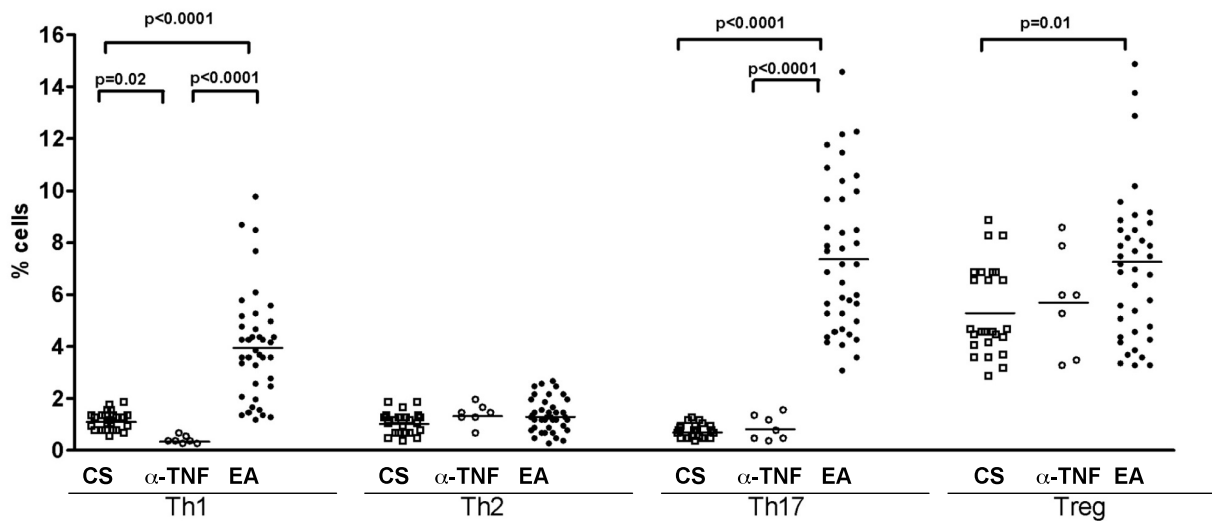


Figura 9. Porcentaje de las subpoblaciones celulares en sangre periférica en condiciones libres de estímulo *ex vivo*. Controles sanos (CS), pacientes con espondilitis anquilosante tratados con agentes bloqueadores del TNF- α (α -TNF) y sin tratamiento biológico (EA). Donde Th1 se tiñó con anti-IFN- γ -APC-Cy7, Th2 con anti-IL-4-PE, Th17 con anti-IL-17A-PE (BD) y Tregs con anti-Foxp3-FITC.

8. Discusión

Se identificó un aumento de los linfocitos CD4⁺ productores de IL-17 en sangre periférica de pacientes con EA, lo que representa el primer reporte que demuestra dicha polarización de la respuesta inmune celular en condiciones libres de estímulo *ex vivo*. Esta producción espontánea de citocinas ha sido reportada en infecciones ⁹⁰; la persistencia de este estímulo podría promover la diferenciación de las subpoblaciones de las células T asociadas con las enfermedades autoinmunes inflamatorias, como las Th17. En el grupo de pacientes con EA también se encontró un incremento en las subpoblaciones Th1 y Treg. Previamente se ha reportado un aumento en la frecuencia de la población de las células Th17 en células mononucleares tanto en pacientes con EA como con AR ¹⁶, mientras que otros estudios han mostrado dicho aumento sólo en las SpA ¹⁷ al igual que nuestros resultados. Estos diferentes resultados pueden deberse al hecho de que las células Th17 en estos trabajos fueron cuantificadas después de recibir estímulos con mitógenos o con anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie como el antiCD3/CD28. A pesar de que el uso de anticuerpos antiCD3/CD28 provee de un estímulo más fisiológico que el uso de PMA/ionomicina, ambos envían señales intracelulares que activan a los linfocitos T y esta activación podría no reflejar el estado de las subpoblaciones de células T en condiciones basales.

Si bien el tratamiento con bloqueadores de TNF- α ha sido estudiado desde diferentes perspectivas, éste es el primer reporte en humanos sobre su efecto en esta nueva subpoblación de células T efectoras. En este grupo de pacientes con

EA encontramos no sólo disminución de las células Th17 sino también de las Th1 y de las citocinas en suero correspondientes a cada subpoblación. El incremento en la subpoblación Th1 se encontró tanto en los pacientes con AR como en aquellos con EA sin tratamiento con este fármaco biológico lo que sugiere que vías de señalización a través de la subunidad p40 por las que el TNF- α podría regular ambas poblaciones ⁹. Un estudio previo en modelos murinos ha reportado que el uso de agentes bloqueadores del TNF- α , ya sea con el receptor soluble o con anticuerpos monoclonales, previene la migración de las subpoblaciones de los ganglios linfáticos a la periferia ⁸. Además se ha reportado que el TNF- α actúa en la diferenciación de las células dendríticas, que a la vez son capaces de favorecer la diferenciación de las subpoblaciones de células T caracterizadas por la producción de citocinas inflamatorias como son la Th1 y la Th17, y que el uso de agentes bloqueadores del TNF- α en pacientes con EA previene la maduración de las células dendríticas MHC-II mieloides y disminuye el número de células T productoras de TNF- α , IFN- γ , y IL2 ^{9, 10}.

En el modelo de plasticidad celular propuesto por Lohr y cols. ³⁴, la respuesta inflamatoria iniciada por la producción de IL-6 favorece la diferenciación de las células Th17 que a su vez, favorecen el desarrollo de las Th1, teniendo ambas subpoblaciones una participación importante en la fase aguda de las enfermedades ³⁴. Esta fase es seguida por la inhibición de las células Th1 y el predominio de las Th17 y acompañada por el incremento en las manifestaciones clínicas, que nuevamente favorece el incremento de las células Th1 pero esta vez con el de las células Treg, ambas disminuyen el número de células Th17, siendo

en esta tercera y última fase donde las células Treg llevan a la recuperación clínica ³⁴.

En la espondilitis anquilosante, que es una enfermedad inflamatoria crónica, la presencia de un ambiente persistentemente pro-inflamatorio favorece la diferenciación a células Th1 y Th17. Es posible que el incremento observado en las células Treg sea un intento de los mecanismos de tolerancia periférica de controlar la respuesta inflamatoria pero que esta capacidad supresora esté siendo sobrepasada, que las células efectoras no sean susceptibles a ser reguladas ^{44, 91} o que sean células activadas con expresión temporal de los marcadores de las células Treg. También se ha reportado una vía común de diferenciación de las células Treg y Th17, lo que acaso implique que las células identificadas como CD4⁺ FOXP3⁺ en los pacientes con EA se encuentren comprometidas a diferenciarse a células productoras de IL-17 ⁵⁸.

En conclusión, este trabajo demuestra la polarización de las subpoblaciones de células T en una enfermedad autoinmune sin estímulos posteriores a su obtención, lo que permite valorar la respuesta celular real de la enfermedad y sus modificaciones con el uso de agentes biológicos, como son los bloqueadores del TNF- α .

9. Perspectivas

- Análisis con estimulación *in vitro* de la polarización de las células T en pacientes con EA.
- Distribución de las células T CD4⁺ vírgenes, de memoria y efectoras en pacientes con EA.
- Efecto de la terapia con “agentes biológicos” sobre las poblaciones de células T CD4⁺ y células dendríticas.

10. Referencias

1. Burgos-Vargas, R., Pacheco-Tena, C., and Vazquez-Mellado, J., The juvenile-onset spondyloarthritides: rationale for clinical evaluation. **Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.** 2002. 16: 551-572.
2. Sanmartí Sala,R., **Manual SER de las Enfermedades Reumáticas.** In 2004, pp 266-273.
3. Inman, R. D., Mechanisms of disease: infection and spondyloarthritis. **Nat.Clin.Pract.Rheumatol.** 2006. 2: 163-169.
4. Jacques, P., Mielants, H., Coppieters, K., De, V. M., and Elewaut, D., The intimate relationship between gut and joint in spondyloarthropathies. **Curr.Opin.Rheumatol.** 2007. 19: 353-357.
5. Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R., Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity.** 2009. 30: 646-655.
6. Bal, A., Unlu, E., Bahar, G., Aydog, E., Eksioglu, E., and Yorgancioglu, R., Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. **Clin.Rheumatol.** 2007. 26: 211-215.
7. Sethi, G., Sung, B., and Aggarwal, B. B., TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front Biosci.** 2008. 13: 5094-5107.
8. Notley, C. A., Inglis, J. J., Alzabin, S., McCann, F. E., McNamee, K. E., and Williams, R. O., Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. **J.Exp.Med.** 2008. 205: 2491-2497.
9. Iwamoto, S., Iwai, S., Tsujiyama, K., Kurahashi, C., Takeshita, K., Naoe, M., Masunaga, A., Ogawa, Y., Oguchi, K., and Miyazaki, A., TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. **J.Immunol.** 2007. 179: 1449-1457.
10. Pang, L., Wang, L., Suo, T., Hao, H., Fang, X., Jia, J., Huang, F., and Tang, J., Tumor necrosis factor-alpha blockade leads to decreased peripheral T cell reactivity and increased dendritic cell number in peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis. **J.Rheumatol.** 2008. 35: 2220-2228.

11. Zou, J., Rudwaleit, M., Brandt, J., Thiel, A., Braun, J., and Sieper, J., Down-regulation of the nonspecific and antigen-specific T cell cytokine response in ankylosing spondylitis during treatment with infliximab. ***Arthritis Rheum.*** 2003. 48: 780-790.
12. Zou, J., Rudwaleit, M., Brandt, J., Thiel, A., Braun, J., and Sieper, J., Up regulation of the production of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma by T cells in ankylosing spondylitis during treatment with etanercept. ***Ann.Rheum.Dis.*** 2003. 62: 561-564.
13. Zou, J. X., Braun, J., and Sieper, J., Immunological basis for the use of TNFalpha-blocking agents in ankylosing spondylitis and immunological changes during treatment. ***Clin.Exp.Rheumatol.*** 2002. 20: S34-S37.
14. Gaston, J. S., Cytokines in arthritis--the 'big numbers' move centre stage. ***Rheumatology.(Oxford)*** 2008. 47: 8-12.
15. Wendling, D., Cedoz, J. P., Racadot, E., and Dumoulin, G., Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. ***Joint Bone Spine*** 2007. 74: 304-305.
16. Jandus, C., Bioley, G., Rivals, J. P., Dudler, J., Speiser, D., and Romero, P., Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. ***Arthritis Rheum.*** 2008. 58: 2307-2317.
17. Shen, H., Goodall, J. C., and Hill Gaston, J. S., Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. ***Arthritis Rheum.*** 2009. 60: 1647-1656.
18. Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W. E., Differentiation of effector CD4 T cell populations. ***Annu.Rev.Immunol.*** 2010. 28: 445-489.
19. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. ***J.Immunol.*** 1986. 136: 2348-2357.
20. Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T., Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. ***Nat.Immunol.*** 2005. 6: 1123-1132.

21. Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C., A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat.Immunol.** 2005. 6: 1133-1141.
22. Yao, Z., Fanslow, W. C., Seldin, M. F., Rousseau, A. M., Painter, S. L., Comeau, M. R., Cohen, J. I., and Spriggs, M. K., Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. **Immunity.** 1995. 3: 811-821.
23. Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das, M. B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., and Lebecque, S., T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J.Exp.Med.** 1996. 183: 2593-2603.
24. Kennedy, J., Rossi, D. L., Zurawski, S. M., Vega, F., Jr., Kastelein, R. A., Wagner, J. L., Hannum, C. H., and Zlotnik, A., Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR + CD4-CD8-T cells. **J.Interferon Cytokine Res.** 1996. 16: 611-617.
25. Kolls, J. K. and Linden, A., Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity.** 2004. 21: 467-476.
26. Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., and Armitage, R. J., Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. **J.Immunol.** 1995. 155: 5483-5486.
27. Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J. C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P., and de Waal, M. R., Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nat.Immunol.** 2007. 8: 950-957.
28. Mosmann, T. R. and Sad, S., The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol.Today** 1996. 17: 138-146.
29. Chen, Z., Tato, C. M., Muul, L., Laurence, A., and O'Shea, J. J., Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. **Arthritis Rheum.** 2007. 56: 2936-2946.
30. Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F., Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are

essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat.Immunol.** 2007. 8: 942-949.

31. Harris, T. J., Grosso, J. F., Yen, H. R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E. L., Getnet, D., Goldberg, M. V., Maris, C. H., Housseau, F., Yu, H., Pardoll, D. M., and Drake, C. G., Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. **J.Immunol.** 2007. 179: 4313-4317.
32. Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M., and Dong, C., T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. **Immunity.** 2008. 28: 29-39.
33. Hu, Y., Shen, F., Crellin, N. K., and Ouyang, W., The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** 2011. 1217: 60-76.
34. Lohr, J., Knoechel, B., and Abbas, A. K., Regulatory T cells in the periphery. **Immunol.Rev.** 2006. 212: 149-162.
35. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., and Harrington, L. E., IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu.Rev.Immunol.** 2007. 25: 821-852.
36. Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V. K., Interleukin-17 and type 17 helper T cells. **N.Engl.J.Med.** 2009. 361: 888-898.
37. Stockinger, B. and Veldhoen, M., Differentiation and function of Th17 T cells. **Curr.Opin.Immunol.** 2007. 19: 281-286.
38. Shevach, E. M., Regulatory T cells in autoimmunity. **Annu.Rev.Immunol.** 2000. 18: 423-449.
39. Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and 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 a possible cause of autoimmune disease. **J.Exp.Med.** 1985. 161: 72-87.
40. Sakaguchi, S. and Sakaguchi, N., Organ-specific autoimmune disease induced in mice by elimination of T cell subsets. V. Neonatal administration

- of cyclosporin A causes autoimmune disease. *J.Immunol.* 1989. 142: 471-480.
41. 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.
 42. Stephens, L. A., Mottet, C., Mason, D., and Powrie, F., Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur.J.Immunol.* 2001. 31: 1247-1254.
 43. Levings, M. K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M. G., Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J.Exp.Med.* 2001. 193: 1295-1302.
 44. Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A., CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J.Immunol.* 2001. 167: 1245-1253.
 45. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y., Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 2003. 4: 330-336.
 46. Powell, B. R., Buist, N. R., and Stenzel, P., An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J.Pediatr.* 1982. 100: 731-737.
 47. Viguier, M., Lemaitre, 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 function of infiltrating T cells. *J.Immunol.* 2004. 173: 1444-1453.
 48. Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I., Huizinga, T. W., and Toes, R. E., Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur.J.Immunol.* 2007. 37: 129-138.
 49. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., and Hafler, D. A., FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat.Rev.Immunol.* 2010. 10: 490-500.

50. Curotto de Lafaille, M. A. and Lafaille, J. J., Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009. 30: 626-635.
51. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M., Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J.Exp.Med.* 2003. 198: 1875-1886.
52. Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., and Powrie, F., A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J.Exp.Med.* 2007. 204: 1757-1764.
53. Haribhai, D., Williams, J. B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E. G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S. H., Relland, L. M., Wise, P. M., Chen, A., Zheng, Y. Q., Simpson, P. M., Gorski, J., Salzman, N. H., Hessner, M. J., Chatila, T. A., and Williams, C. B., A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity*. 2011. 35: 109-122.
54. Pacholczyk, R., Kern, J., Singh, N., Iwashima, M., Kraj, P., and Ignatowicz, L., Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells. *Immunity*. 2007. 27: 493-504.
55. Pacholczyk, R. and Kern, J., The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology* 2008. 125: 450-458.
56. Josefowicz, S. Z. and Rudensky, A., Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 2009. 30: 616-625.
57. Hori, S., Developmental plasticity of Foxp3+ regulatory T cells. *Curr.Opin.Immunol.* 2010. 22: 575-582.
58. Beriou, G., Costantino, C. M., Ashley, C. W., Yang, L., Kuchroo, V. K., Baecher-Allan, C., and Hafler, D. A., IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 2009. 113: 4240-4249.
59. Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J., How regulatory T cells work. *Nat.Rev.Immunol.* 2008. 8: 523-532.

60. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F., An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 1999. 190: 995-1004.
61. Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., and Geginat, J., Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010. 21: 331-344.
62. Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K., Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol.Rev.* 2006. 212: 28-50.
63. Jager, A. and Kuchroo, V. K., Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand.J.Immunol.* 2010. 72: 173-184.
64. Breban, M., Genetics of spondyloarthritis. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 2006. 20: 593-599.
65. Braun, J., Brandt, J., Listing, J., Zink, A., Alten, R., Golder, W., Gromnica-Ihle, E., Kellner, H., Krause, A., Schneider, M., Sorensen, H., Zeidler, H., Thriene, W., and Sieper, J., Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet* 2002. 359: 1187-1193.
66. Brandt, J., Khariouzov, A., Listing, J., Haibel, H., Sorensen, H., Grassnickel, L., Rudwaleit, M., Sieper, J., and Braun, J., Six-month results of a double-blind, placebo-controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2003. 48: 1667-1675.
67. Davis, J. C., Jr., Van Der Heijde, D., Braun, J., Dougados, M., Cush, J., Clegg, D. O., Kivitz, A., Fleischmann, R., Inman, R., and Tsuji, W., Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2003. 48: 3230-3236.
68. Gorman, J. D., Sack, K. E., and Davis, J. C., Jr., Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha. *N.Engl.J.Med.* 2002. 346: 1349-1356.
69. Van Der Heijde, D., Dijkmans, B., Geusens, P., Sieper, J., DeWoody, K., Williamson, P., and Braun, J., Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT). *Arthritis Rheum.* 2005. 52: 582-591.

70. Baraliakos, X., Listing, J., Brandt, J., Zink, A., Alten, R., Burmester, G., Gromnica-Ihle, E., Kellner, H., Schneider, M., Sorensen, H., Zeidler, H., Rudwaleit, M., Sieper, J., and Braun, J., Clinical response to discontinuation of anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis after 3 years of continuous treatment with infliximab. *Arthritis Res.Ther.* 2005. 7: R439-R444.
71. Brandt, J., Marzo-Ortega, H., and Emery, P., Ankylosing spondylitis: new treatment modalities. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 2006. 20: 559-570.
72. Calin, A., Dijkmans, B. A., Emery, P., Hakala, M., Kalden, J., Leirisalo-Repo, M., Mola, E. M., Salvarani, C., Sanmarti, R., Sany, J., Sibilia, J., Sieper, J., van der Linden, S., Veys, E., Appel, A. M., and Fatenejad, S., Outcomes of a multicentre randomised clinical trial of etanercept to treat ankylosing spondylitis. *Ann.Rheum.Dis.* 2004. 63: 1594-1600.
73. Weinreich, S. S., Hoebe-Hewryk, B., van der Horst, A. R., Boog, C. J., and Ivanyi, P., The role of MHC class I heterodimer expression in mouse ankylosing enthesopathy. *Immunogenetics* 1997. 46: 35-40.
74. Rehakova, Z., Capkova, J., Stepankova, R., Sinkora, J., Louzecka, A., Ivanyi, P., and Weinreich, S., Germ-free mice do not develop ankylosing enthesopathy, a spontaneous joint disease. *Hum.Immunol.* 2000. 61: 555-558.
75. Hammer, R. E., Maika, S. D., Richardson, J. A., Tang, J. P., and Taurog, J. D., Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990. 63: 1099-1112.
76. May, E., Dorris, M. L., Satumtira, N., Iqbal, I., Rehman, M. I., Lightfoot, E., and Taurog, J. D., CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J.Immunol.* 2003. 170: 1099-1105.
77. Rudwaleit, M., Siepert, S., Yin, Z., Eick, J., Thiel, A., Radbruch, A., Sieper, J., and Braun, J., Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Ann.Rheum.Dis.* 2001. 60: 36-42.
78. Baeten, D., Van, D. N., Van den Bosch, F., Kruithof, E., De, V. M., Mielants, H., Veys, E. M., and De, K. F., Impaired Th1 cytokine production in spondyloarthritis is restored by anti-TNFalpha. *Ann.Rheum.Dis.* 2001. 60: 750-755.

79. Claudepierre, P., Rymer, J. C., and Chevalier, X., IL-10 plasma levels correlate with disease activity in spondyloarthritis. *J.Rheumatol.* 1997. 24: 1659-1661.
80. Goverman, J., Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat.Rev.Immunol.* 2009. 9: 393-407.
81. Nestle, F. O., Kaplan, D. H., and Barker, J., Psoriasis. *N.Engl.J.Med.* 2009. 361: 496-509.
82. van den Berg, W. B. and Miossec, P., IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat.Rev.Rheumatol.* 2009. 5: 549-553.
83. Ahern, P. P., Izcue, A., Maloy, K. J., and Powrie, F., The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunol.Rev.* 2008. 226: 147-159.
84. Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X. P., Hirahara, K., and O'Shea, J. J., T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends Immunol.* 2011. 32: 395-401.
85. van der Linden, S., Valkenburg, H. A., and Cats, A., Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984. 27: 361-368.
86. Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H., Luthra, H. S., and ., The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988. 31: 315-324.
87. Garrett, S., Jenkinson, T., Kennedy, L. G., Whitelock, H., Gaisford, P., and Calin, A., A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J.Rheumatol.* 1994. 21: 2286-2291.
88. Cardiel, M. H., Londono, J. D., Gutierrez, E., Pacheco-Tena, C., Vazquez-Mellado, J., and Burgos-Vargas, R., Translation, cross-cultural adaptation, and validation of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and the Dougados Functional Index (DFI) in a Spanish speaking population with spondyloarthropathies. *Clin.Exp.Rheumatol.* 2003. 21: 451-458.
89. Fuchs, H. A., Brooks, R. H., Callahan, L. F., and Pincus, T., A simplified twenty-eight-joint quantitative articular index in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989. 32: 531-537.

90. Nakamura, T., Nishiura, Y., Ichinose, K., Shirabe, S., Tsujino, A., Goto, H., Furuya, T., and Nagataki, S., Spontaneous proliferation of and cytokine production by T cells adherent to human endothelial cells in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Intern.Med.* 1996. 35: 195-199.

91. Vargas-Rojas, M. I., Crispin, J. C., Richaud-Patin, Y., and Alcocer-Varela, J., Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* 2008. 17: 289-294.



Asociación
Colombiana de
Reumatología

LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE REUMATOLOGÍA
Y EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL XII CONGRESO COLOMBIANO DE
REUMATOLOGÍA

CERTIFICAN QUE LOS DOCTORES:

**LEONARDO LIMON-CAMACHO, MARIA INES VARGAS-ROJAS, JULIO
CASASOLA-VARGAS, JOSE F. MOCTEZUMA, RUBEN BURGOS-VARGAS, LUIS
LLORENTE**

FUERON MERECEDORES DEL PREMIO AL MEJOR TRABAJO EXTRANJERO,
PRESENTADO EN TEXTO COMPLETO EN EL XII CONGRESO COLOMBIANO DE
REUMATOLOGÍA

**Con el Trabajo: "Caracterización de las subpoblaciones de células Th1, Th2,
Th17 y T reguladoras en sangre periférica de pacientes con espondilitis
anquilosante"**

Bogotá D.C. Agosto 16 de 2009

Dra. Monique Chalem Ch.
Presidente
XII Congreso Colombiano de Reumatología

Dr. Elías Forero Illera
Presidente
Asociación Colombiana de Reumatología



XXXVIII CONGRESO MEXICANO DE REUMATOLOGÍA



Dr. Leonardo Limón Camacho

Hospital Central Norte PEMEX

Por haber obtenido el premio "Donato Alarcón Segovia" en la categoría de Mejor Trabajo de Investigación Básica, con el título

Células T en Sangre Periférica no Estimulada de Pacientes con Espondilitis Anquilosante: Los Bloqueadores del TNF- α Disminuyen las Subpoblaciones Th1 y Th17

Morelia, Michoacán, 18 de febrero de 2010.

Dr. Federico Galván Villegas
Presidente

Dra. Olga Lidia Vera Lastra
Vicepresidenta

Dra. Angélica H. Peña Ayala
Secretaria

Dr. Miguel Ángel Saavedra Salinas
Tesorero



**FACULTAD DE CIENCIAS
MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHAVEZ"**

ESTE DOCUMENTO QUEDO REGISTRADO EN LA COORDINACION DE EDUCACION MEDICA CONTINUA A FOJAS LXVI DEL LIBRO 1 DE CURSOS, TALLERES, SEMINARIOS, SIMPOSIUM Y DIPLOMADOS. AMPARANDO UN VALOR CURRICULAR DE :

-08- HORAS TEORICAS, -16- HORAS PRACTICAS , REGISTRO No. C-12-2010

EL JEFE DE LA COORDINACION DE EDUCACION MEDICA CONTINUA EN FUNCIONES

MEM. YOLANDA OCHOA ARCEO



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHAVEZ"
COORD. DE EDUCACION MEDICA CONTINUA



The Journal of Rheumatology

Volume 39, no. 4

In Vivo Peripheral Blood Proinflammatory T Cells in Patients with Ankylosing Spondylitis

LEONARDO LIMÓN-CAMACHO, MARÍA INÉS VARGAS-ROJAS, JANITZIA VÁZQUEZ-MELLADO, JULIO CÁASOLA-VARGAS, JOSÉ F. MOCTEZUMA, RUBÉN BURGOS-VARGAS and LUIS LLORENTE

J Rheumatol 2012;39;830-835
<http://www.jrheum.org/content/39/4/830>

1. Sign up for our monthly e-table of contents
<http://www.jrheum.org/cgi/alerts/etoc>
2. Information on Subscriptions
<http://jrheum.com/subscribe.html>
3. Have us contact your library about access options
Refer_your_library@jrheum.com
4. Information on permissions/orders of reprints
<http://jrheum.com/reprints.html>

The Journal of Rheumatology is a monthly international serial edited by Duncan A. Gordon featuring research articles on clinical subjects from scientists working in rheumatology and related fields.

In Vivo Peripheral Blood Proinflammatory T Cells in Patients with Ankylosing Spondylitis

LEONARDO LIMON-CAMACHO, MARÍA INÉS VARGAS-ROJAS, JANITZIA VÁZQUEZ-MELLADO, JULIO CASASOLA-VARGAS, JOSÉ F. MOCTEZUMA, RUBÉN BURGOS-VARGAS, and LUIS LLORENTE

ABSTRACT. *Objective.* Previous reports have shown an increase in peripheral blood mononuclear cells' (PBMC) Th17 cell subpopulation and tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion after *in vitro* stimulation with anti-CD3/CD28 or phorbol myristate acetate/ionomycin in ankylosing spondylitis (AS). The aim of our study was to determine whether there is a Th17 polarization not subjected to *in vitro* stimulation in patients with AS.

Methods. Nonstimulated PBMC were analyzed from 46 patients with AS, including 7 (15.2%) receiving tumor necrosis factor- α (TNF- α) inhibitors, 20 patients with rheumatoid arthritis, and 25 healthy controls. The surface phenotype of freshly isolated PBMC was determined by flow cytometry. Th1, Th2, Th17, and Treg subsets were defined as CD3+CD4+IFN- γ +, CD3+CD4+IL-4+, CD3+CD4+IL-17A+, and CD3+CD4+FoxP3+, respectively. Serum cytokines and interleukin 8 (IL-8) levels were quantified by Luminex technology.

Results. The percentages of Th17 and Th1 cells in AS were higher than in healthy controls (7.4% \pm 1.8% vs 0.7% \pm 0.2% and 4.0% \pm 1.3% vs 1.1% \pm 0.3%, respectively; $p < 0.0001$). Th17 and Th1 cell subsets in patients taking TNF- α inhibitors were lower than in those naive to such therapeutics and similar to healthy controls. Serum levels of IL-6, IL-17A, TNF- α , and IL-8 were significantly higher in patients with AS compared to controls.

Conclusion. The percentages of Th17 and Th1 cells in PBMC without *in vitro* stimulation, as well as cytokine and IL-8 levels, were significantly increased in patients with AS compared with healthy controls. These T cell subsets and cytokine profiles of patients with AS taking TNF- α inhibitors were similar to those of healthy controls. (First Release Feb 15 2012; J Rheumatol 2012;39:830-5; doi:10.3899/jrheum.110862)

Key Indexing Terms:

TH17

ANKYLOSING SPONDYLITIS

TUMOR NECROSIS FACTOR- α

One of the most important changes in immunology concepts in recent years is the emergence of Th17 cells as a new subpopulation of CD4+ T cells characterized by the production of proinflammatory cytokines, particularly interleukin 17 (IL-17A)^{1,2}, but also IL-6, IL-17F, IL-22, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Moreover, Th17 cells have been related to autoimmune diseases³. They also stimulate the formation of osteoclasts and

consequently bone resorption, and they recruit neutrophils and monocytes^{4,5,6}. Although the cause of ankylosing spondylitis (AS) is still unknown, a number of studies have clearly demonstrated a significant role of TNF- α in the pathogenesis of the disease⁷. The participation of TNF- α in the pathogenesis of AS has been demonstrated by the clinical improvement observed with the use of TNF- α blockers in these patients^{8,9,10,11}. However, the effect of this treatment on the effector T cell subpopulations in circulating blood is still unknown.

Reports have dealt with the possible role of Th17 cells in AS and related spondyloarthritis (SpA). Indeed, sera of patients with AS have increased levels of IL-17 and TNF- α ^{12,13} as well as Th17 cells after *in vitro* stimulation^{14,15}. It is important, however, to determine whether there is a polarization to a Th17 response not subjected to *in vitro* stimulation, by either anti-CD3/CD28 antibodies or phorbol myristate acetate/ionomycin.

The aim of our study was to evaluate the phenotype of freshly isolated circulating CD4+ T cells from patients with AS, including juvenile and adult-onset forms, as well as those naive to TNF- α blockers and those receiving such biologic agents, and compare them with healthy controls and patients with rheumatoid arthritis (RA).

From the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Hospital General de México, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.

Supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico (CONACYT grant no. 084669).

L. Limón-Camacho, MD, PhD, UNAM; M.I. Vargas-Rojas, MD, PhD, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas; J. Vázquez-Mellado, MD, PhD; J. Casasola-Vargas, MD; J.F. Moctezuma, MD; R. Burgos-Vargas, MD, Hospital General de México; L. Llorente, MD, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Address correspondence to Dr. L. Llorente, Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15 Tlalpan, Mexico City, D.F. 14000, Mexico. E-mail: luisllorentepeters57@gmail.com

Accepted for publication November 9, 2011.

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2012. All rights reserved.

MATERIALS AND METHODS

We studied peripheral blood samples of 46 patients with AS diagnosed according to the modified New York criteria¹⁶, including 28 with juvenile-onset (60.9%; 25 males) and 18 with adult-onset (39.1%; 13 males) disease; 7 (15.2%) received TNF- α inhibitors (6 of them infliximab and 1 etanercept). Twenty-six patients (54.2%), including 1 receiving a TNF- α blocker, scored ≥ 4 on the BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)^{17,18}. We included as controls 20 patients with RA¹⁹ as a joint autoimmune disease as well as 25 healthy controls. Demographic and clinical characteristics of the study population are shown in Table 1.

The study was approved by the Committees of Medical Ethics of our institutions. Only participants who gave informed consent to participate were recruited.

Analysis of the CD4+ T cell subpopulations in mononuclear cells by flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation on Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway). In order to analyze the distribution of Th1, Th2, Th17, and Treg subpopulations, cells were first labeled with both antigen-presenting cell-anti-human CD3 and PECy5-anti-human CD4 monoclonal antibodies (BD PharMingen, San Diego, CA, USA) in 4 separated tubes at room temperature in the dark for 20 min. Cells were washed and permeabilized with cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at 4°C for 20 min. Intracellular staining was performed with a PECy7-anti-human interferon- γ (IFN- γ), PE-anti-human IL-4, PE-anti-human IL-17A, and FITC-anti-human FoxP3 monoclonal antibodies (eBioscience, San Diego, CA, USA). T cell subsets were analyzed with a flow cytometry FACSAria system (BD Biosciences). Isotope controls were used to set the threshold and gates in the cytometer. An electronic gate was made for CD3+CD4+ cells and a total of 50,000 events were recorded for each sample and analyzed with the FACSDiva software (BD Biosciences). Results are expressed as the relative percentage of IFN- γ , IL-4, IL-17A, or FoxP3-expressing cells present in each gate.

Cytokine and IL-8 quantitation by Luminex in serum. Serum concentrations of IL-6, IL-12, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , and IL-8 were measured by Luminex bead-based technology according to the manufacturer's recommendation (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). The detection limit of the experimental system was 2.6, 3.5, 3.3, 6.4, 6.0, and 1.0 pg/ml, respectively. Results were analyzed using Bio-Plex v 4.1 software.

Statistical analysis. Continuous variables were expressed as mean \pm SD. Binomial variables were expressed as frequency and percentages. Chi-square, ANOVA, and t tests were used for comparisons between groups. The p values < 0.05 were considered statistically significant. SPSS version 16 software was used.

RESULTS

Increased percentage of Th1, Th17, and Treg cells in peripheral blood from patients with AS. When comparing the per-

centages of cell populations between juvenile and adult-onset patients with AS, no differences were found (data not shown) and thus both groups were joined for the remaining analyses, here denoted the patients with AS. The percentage of Th17 cells was significantly higher in patients with AS compared with healthy controls [$7.4\% \pm 1.8\%$ vs $0.7\% \pm 0.2\%$ ($p < 0.0001$); Figure 1].

A certain trend of higher numbers of Th17 cells was observed in patients with RA compared with healthy controls ($p = 0.06$; Figure 2). A clear difference was found, however, in the Th1 cell subpopulation, with an increased percentage in both patients with AS ($4.0\% \pm 1.3\%$) and those with RA ($4.2\% \pm 1.5\%$) compared with healthy controls [$1.1\% \pm 0.3\%$ ($p < 0.0001$); Table 2]. These results showed a quantitative increase in the Th17 cell subpopulation of peripheral blood from patients with AS, while greater percentages of the Th1 cell subpopulation were similar in both inflammatory diseases. There were no statistically significant differences in the Th2 cell population percentage in the 3 groups under study [AS $1.3\% \pm 0.4\%$, RA $1.1\% \pm 0.3\%$ ($p = 0.49$), and healthy controls $1.0\% \pm 0.4\%$ ($p = 0.10$)]. The percentage of Treg cells was also investigated according to FoxP3 expression. These cells were increased in patients with AS compared with healthy controls [$7.3\% \pm 1.3\%$ vs $5.3\% \pm 1.7\%$ ($p = 0.01$); Table 2 and Figure 2].

Cell populations in patients treated with TNF- α inhibitors. Seven patients with AS were receiving treatment with biological agents: 6 with infliximab and 1 with etanercept. When the analysis was made on the percentages of CD3+CD4+ subpopulations, we found lower percentages of Th17 cells in these patients compared with AS patients who received other treatments [$0.8\% \pm 0.2\%$ vs $7.4\% \pm 1.8\%$ ($p < 0.0001$)], and percentages similar to those found in controls [$0.7\% \pm 0.2\%$ ($p = 0.85$); Figure 3]. Further, it was observed that patients treated with TNF- α blockers had lower percentages of Th1 cells than healthy controls [$0.7\% \pm 0.2\%$ vs $1.1\% \pm 0.3\%$ ($p = 0.02$)]. No significant difference was found in Treg cells [AS patients with biological treatment $5.7\% \pm 1.8\%$; controls $5.3\% \pm 1.7\%$ ($p = 0.74$)].

Serum cytokines and IL-8 levels were quantified in 11

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population. Values are expressed as mean \pm SD.

Characteristic	AS, n = 39	AS with Anti-TNF- α , n = 7	RA, n = 20	Healthy Controls, n = 25	p*
Age, yrs	32 \pm 13	28 \pm 11	47 \pm 14	32 \pm 8	< 0.0001
Sex, M/F	32/7	6/1	5/15	18/7	NS
Age at disease onset, yrs	17 \pm 2	16 \pm 1	43 \pm 3	—	< 0.0001
CRP	14 \pm 3.2	10.4 \pm 6.4	11.7 \pm 3	—	0.8
BASDAI	4.4 \pm 2.4	2.5 \pm 3.4	—	—	< 0.0001
DAS28	—	—	3.8 \pm 1.3	—	ND

* ANOVA. AS: ankylosing spondylitis; RA: rheumatoid arthritis; NS: no significant difference; ND: not determined; CRP: C-reactive protein; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; DAS28: 28-joint Disease Activity Score; TNF: tumor necrosis factor.

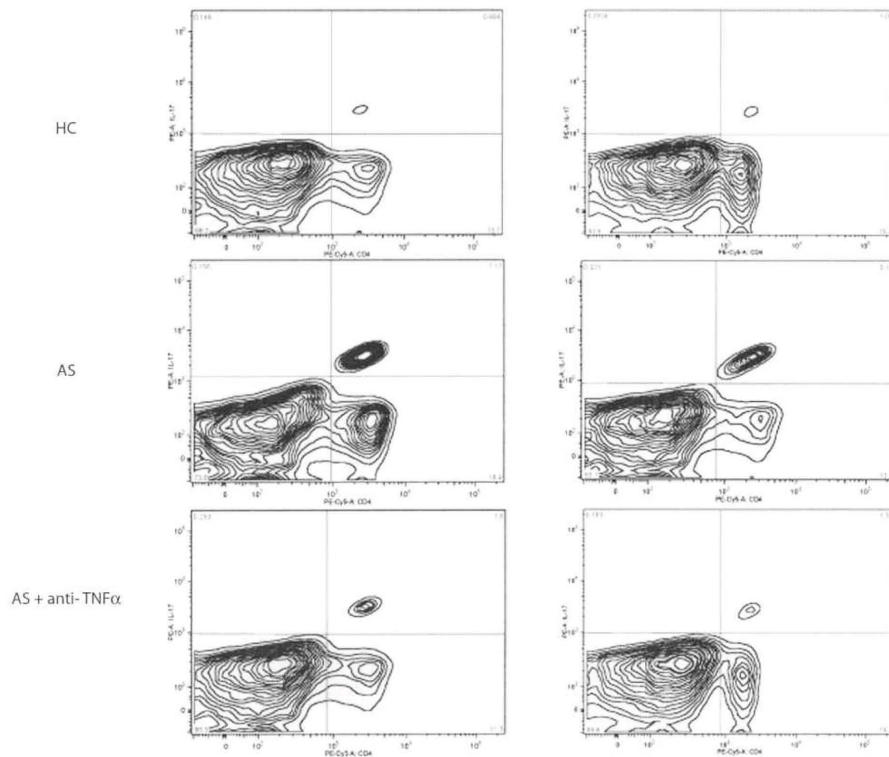


Figure 1. Flow cytometry analysis of the Th17 subpopulations. Representative contour showing *ex vivo*-detected CD4+ T cells producing IL-17A in human peripheral blood lymphocytes from healthy controls (HC), patients with ankylosing spondylitis (AS), and patients with AS treated with TNF- α inhibitors.

selected patients with AS who had BASDAI scores ≥ 6 and Th17 levels $\geq 8\%$; in 5 patients with AS under treatment with TNF- α inhibitors (1 patient with active disease and a missing serum measurement were excluded); and in 8 healthy controls. Elevated serum levels of IL-6, IL-12, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , and IL-8 were found in patients with AS. In all instances, cytokines and IL-8 were significantly higher compared with patients receiving TNF- α blockers and healthy controls (Table 3).

DISCUSSION

We identified an *in vivo* increase of IL-17-producing CD4+ lymphocytes in peripheral blood from patients with AS. This spontaneous production of cytokines has been reported in bacterial infections²⁰. The persistence of this stimulus could promote the differentiation of T cell subpopulations associated with autoimmune inflammatory disease, such as the Th17 cells.

This group of patients also showed an increase in Th1 and Treg cell subpopulations. Reports have shown an increase in the percentage of Th17 cells in mononuclear cells in patients with AS and those with RA¹⁵, while another study shows an increase solely in SpA, very much like our own results¹⁴. These apparent contradictions could be due to the fact that Th17 cells in these studies were quantified after *in vitro* stimuli.

Even though the use of anti-CD3/CD28²¹ antibodies provides a more physiological stimulus for T cells than phorbol myristate acetate/ionomycin²², both send intracellular signals that trigger T lymphocytes. This activation, however, does not reflect the state of T cell subpopulations in basal conditions.

On the other hand, patients treated with TNF- α blockers showed a decrease not only in IFN- γ -producing and IL-17A-producing CD4+ T cells, but also in cytokine levels in serum. It is known that patients with AS have increased levels of TNF- α in serum¹³. This cytokine is a powerful proinflammatory mediator, with the ability to produce inflammation

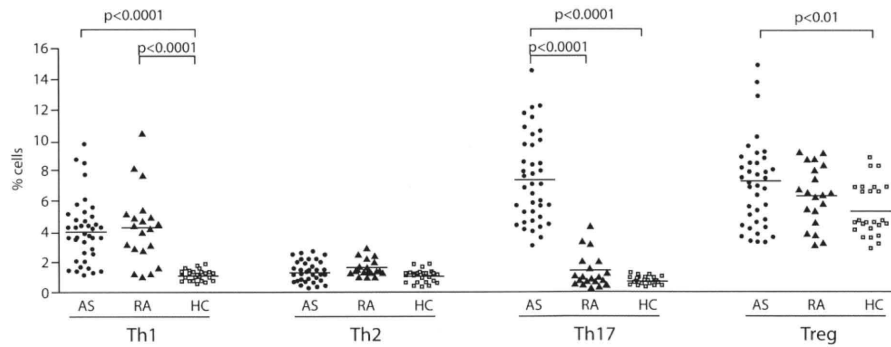


Figure 2. Comparison of the T cell subpopulations between patients with ankylosing spondylitis (AS), patients with rheumatoid arthritis (RA), and healthy controls (HC). Percentages of T cell subpopulations (Th1, Th2, Th17, and Treg) in peripheral blood of HC, patients with AS, and patients with RA.

Table 2. Comparison between groups on T cell subsets in peripheral blood. Values are expressed as mean \pm SD percentage.

Subpopulation	AS, n = 39	AS with Anti-TNF- α , n = 7	RA, n = 20	Healthy Controls, n = 25	p*
Th1	4.0 \pm 1.3	0.7 \pm 0.2	4.2 \pm 1.5	1.1 \pm 0.3	< 0.0001
Th2	1.3 \pm 0.4	1.3 \pm 0.6	1.1 \pm 0.3	1 \pm 0.4	0.2
Th17	7.4 \pm 1.8	0.8 \pm 0.2	1.4 \pm 1.1	0.7 \pm 0.2	< 0.0001
Treg	7.3 \pm 1.3	5.7 \pm 1.8	6.3 \pm 1.9	5.3 \pm 1.7	0.03

* One-way ANOVA. AS: ankylosing spondylitis; TNF: tumor necrosis factor; RA: rheumatoid arthritis.

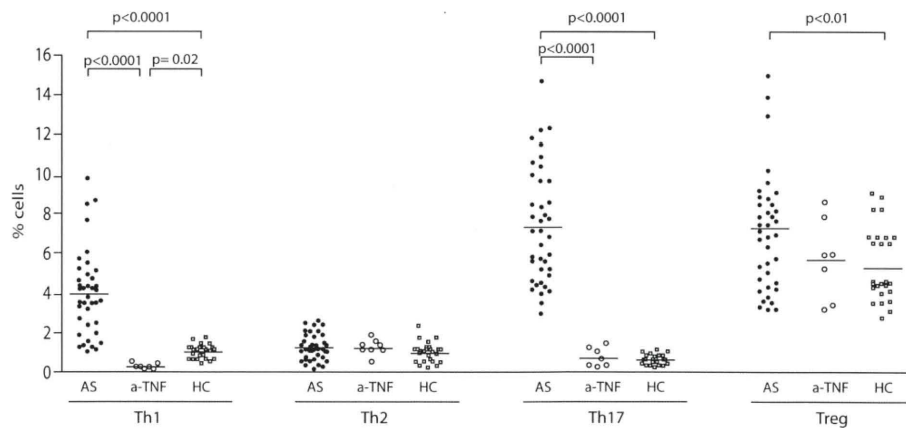


Figure 3. Comparison of the T cell subpopulations between patients with ankylosing spondylitis (AS) and healthy controls (HC). Percentages of T cell subpopulations (Th1, Th2, Th17, and Treg) in peripheral blood of HC, patients with AS, and patients with AS treated with TNF- α inhibitors.

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2012. All rights reserved.

Table 3. Comparison of serum cytokines and IL-8 levels among groups. Values are expressed as mean \pm SD.

Cytokine	AS, n = 11	AS with Anti-TNF- α , n = 5	Controls, n = 8	p*
IL-6, pg/ml	535.2 \pm 84.2	4.4 \pm 0.6	2.5 \pm 0.2	< 0.0001
IL-8, pg/ml	1114.1 \pm 425.9	6.1 \pm 1.2	2.3 \pm 0.2	0.03
IL-12, pg/ml	10.3 \pm 1.8	3 \pm 0.2	3.2 \pm 0.1	0.001
IL-17A, pg/ml	25 \pm 3.2	2.1 \pm 0.5	3.3 \pm 0.2	< 0.0001
IFN- γ , pg/ml	96.1 \pm 16	20.2 \pm 3.1	42.1 \pm 2.3	0.001
TNF- α , pg/ml	126.3 \pm 7.6	4.7 \pm 0.8	6 \pm 0.4	< 0.0001

* One-way ANOVA. AS: ankylosing spondylitis; TNF: tumor necrosis factor; IFN: interferon.

through direct and indirect mechanisms. The clinical improvement of patients with AS who use TNF- α inhibitors indicates the participation of TNF- α in the pathogenesis of AS^{9,10,11}. In animal models of arthritis, it has been shown that the use of TNF- α inhibitors, with the soluble fraction receptor or with the monoclonal antibody, results in a decrease in Th1 and Th17 cells in joints, suggesting common pathways for these cell populations²³. Further, these studies suggest that an explanation for this decrease in T cell subpopulations is that the use of these biological agents prevents cellular migration from the lymphatic nodes to the periphery. However, it has been reported that TNF- α takes part in the differentiation of dendritic cells, which in turn are able to favor the differentiation of Th1 and Th17 effector T cell subpopulations characterized by the production of inflammatory cytokines²⁴, and that the use of TNF- α inhibitors in patients with AS prevents the maturation of MHC-II myeloid dendritic cells and decreases the number of T cells producing TNF- α , IFN- γ , and IL-2^{25,26}.

The balance between effectors and Treg cells in the periphery depends on many variables, such as the concentration and kind of antigen, the target organ, and the cytokines produced by the same T cells and by the antigen-presenting cells, which in turn stimulate the secretion of cytokines by other cell populations, creating a microenvironment that modulates cell differentiation and defines the kind of immune response. In the cell plasticity model proposed by Lohr, *et al*²⁷, a kinetic model of the polarization of immune cell response is shown. In this model, the inflammatory response initiated by the production of IL-6 triggers the differentiation of Th17 cells which, in turn, gives rise to the development of Th1 cells, suggesting the participation of both Th cells in an acute stage of the disease. This phase is followed by the inhibition of Th1 cells and the predominance of Th17 cells, accompanied by the increase of clinical manifestations, which in turn triggers yet again the increase of Th1 cells, a change that together with the increase in Treg cells decreases the number of Th17 cells. It is in this third and last phase that the predominance of the Treg cell population leads to recovery. Within the framework of AS, which is a chronic inflammatory disease with a persistent proinflammatory environment, the conditions for the differentiation of Th1 and Th17 cells are always favorable, and thus a feedback mechanism is created that leads to the perpetuation

of the inflammatory process. It is possible that the increase of Treg cells is caused by an attempt by the peripheral tolerance mechanisms to control the immune response and that the suppressing capacity of Treg cells is surpassed; or it might be that the effector cells are not susceptible to regulation, as seen in other diseases^{28,29}. Another possibility is that the increase of these cells is related to the common differentiation pathways of Treg and Th17 cells, suggesting that cells identified as CD4+FoxP3+ could become IL-17-producing cells³⁰.

Our results suggest a role for Th17 cells in the pathogenesis of AS, and that treatment with TNF- α inhibitors decreases peripheral cell populations characterized by the production of proinflammatory cytokines, such as Th1 and Th17 cell subpopulations.

ACKNOWLEDGMENT

Special thanks to the Postgraduate Unit of the Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4 effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-41.
- Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmune Rev* 2007;6:169-75.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183:2593-603.
- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;8:639-46.
- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000;165:6107-15.
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214:149-60.
- Gorman JD, Sack KE, Davis JC Jr. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibitor of tumor necrosis factor alpha. *N Engl J Med* 2002;346:1349-56.
- Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Brandt J, Sieper J, Braun

- J. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 2 years of treatment with the tumor necrosis factor alpha antibody infliximab. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1462-6.
10. Baraliakos X, Listing J, Brandt J, Haibel H, Rudwaleit M, Sieper J, et al. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 4 years of treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Rheumatology* 2007;46:1450-3.
 11. van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, Ory P, Vosse D, Ni L, et al. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum* 2008;58:1324-31.
 12. Wendling D, Cedoz JP, Racadot E, Dumoulin G. Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2007;74:304-5.
 13. Bal A, Unlu E, Bahar G, Aydog E, Eksioglu E, Yorgancioglu R. Comparison of serum IL-18, sIL-2R, IL-6, and TNF- α levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2007;26:2011-5.
 14. Jandus C, Bioley G, Rivals JP, Dudler J, Speiser D, Romero P. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum* 2008;58:2307-17.
 15. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1647-56.
 16. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984;27:361-8.
 17. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: The Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994;21:2286-91.
 18. Cardiel MH, Londoño JD, Gutiérrez E, Pacheco-Tena C, Vazquez-Mellado J, Burgos-Vargas R. Translation, cross-cultural adaptation, and validation of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and the Dougados Functional Index (DFI) in a Spanish speaking population with spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:451-8.
 19. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;31:315-24.
 20. Jha R, Srivastava P, Salhan S, Finckh A, Gabay C, Mittal A, et al. Spontaneous secretion of interleukin-17 and -22 by human cervical cells in Chlamydia trachomatis infection. *Microbes Infect* 2011;13:167-78.
 21. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 2006;24:133-9.
 22. Balk SD, Morisi A, Gunther HS. Phorbol 12-myristate 13-acetate, ionomycin or ouabain, and raised extracellular magnesium induce proliferation of chicken heart mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6418-21.
 23. Notley CA, Inglis JJ, Alzabin S, McCann FE, McNamee KE, Williams RO. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* 2008;205:2491-7.
 24. Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, Kurahashi C, Takeshita K, Naoe M, et al. TNF- α drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J Immunol* 2007;179:1449-57.
 25. Pang L, Wang L, Suo T, Hao H, Fang X, Jia J, et al. Tumor necrosis factor- α blockade leads to decreased peripheral T cell reactivity and increased dendritic cell number in peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2008;35:2220-8.
 26. Zou J, Rudwaleit M, Brandt J, Thiel A, Braun J, Sieper J. Downregulation of the nonspecific and antigen-specific T cell cytokine response in ankylosing spondylitis during treatment with infliximab. *Arthritis Rheum* 2003;48:780-90.
 27. Lohr J, Knoechel B, Caretto D, Abbas AK. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. *Microbes Infect* 2009;11:589-93.
 28. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4(+)CD25(high) regulatory T-cell function. *J Immunol* 2002;169:6210-7.
 29. Vargas-Rojas MI, Crispín JC, Richaud-Patin, Alcocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* 2008;17:289-94.
 30. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, et al. IL-17 producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 2009;113:4240-9.