



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE Mestrado Integrado  
EM MEDICINA**

**ANA RAQUEL SOARES DA CRUZ**

***PAPEL DAS TREGS NOS MECANISMOS  
FISIOPATOLÓGICOS DAS DOENÇAS  
AUTOIMUNES***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:**

**DRA. SOFIA VALE PEREIRA**

**PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO**

**MARÇO 2015**

# ÍNDICE

---

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
MATERIAIS E MÉTODOS .....	6
INTRODUÇÃO .....	7
CÉLULAS T REGULADORAS .....	9
Definição.....	9
Caracterização .....	10
Mecanismo de ação .....	15
DOENÇAS AUTOIMUNES.....	20
Definição.....	20
Mecanismos Fisiopatológicos Comuns .....	22
O EXEMPLO DA ARTRITE REUMATOIDE.....	26
Definição.....	26
Etiologia.....	26
Diagnóstico .....	28
MANIPULAÇÃO DAS TREG COMO ALVO TERAPÊUTICO.....	35
DISCUSSÃO/CONCLUSÃO .....	40
AGRADECIMENTOS .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

# ABREVIATURAS

---

A2AR: Recetor A2 da adenosina

AINES: Anti-inflamatórios não esteroides

AMP: Adenosina monofosfato

ANA: Anticorpo antinuclear

Anti-CCP: Antipéptido citrulinado cíclico

APC: Células apresentadoras de antígeno

ATRA: Ácido All –Trans Retinóico

cAMP: Adenosina Monofosfato Cíclico

Bregs: Células B reguladoras

CTLA-4: *Cytotoxic lymphocyte Associated Ag-4*

DAS28: *Disease Activity Score 28*

DM: *Diabetes Mellitus*

DMARDS: *Disease Modifying Antirheumatic Drugs*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

Foxp3: *Forkhead Box Protein 3*

FR: Fator reumatoide

GITR: *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor*

IFN- $\gamma$ : Interferão  $\gamma$

iTregs: *induced* Tregs

LAG-3: *Lymphocyte-activation gene 3*

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

mi-RNAs: micro-RNAs

nTregs: *natural* Tregs

PCR: Proteína C reativa

RNA: *Ribonucleic acid*

TCR: *T Cell Receptor*

TGF- $\beta$ : *Tumor growth factor  $\beta$*

Th3: *T helper 3 cell*

Th17: *T helper 17 cell*

TNFR2: *Tumor necrosis factor receptor 2*

Tr1: *Type 1 regulatory cell*

Tregs: *Regulatory T cells*

VIP: *Péptido intestinal vasoativo*

VS: *Velocidade de sedimentação*

# RESUMO

---

Este trabalho teve como objetivo a revisão bibliográfica dos principais avanços no conhecimento e compreensão dos mecanismos de ação das células T reguladoras e do seu papel na fisiopatologia das doenças autoimunes, particularmente da Artrite Reumatoide.

As células T reguladoras são uma pequena população de células T que apresenta capacidade para induzir supressão das células T efectoras, desempenhando um papel fundamental no processo de tolerância imunológica. Alguns estudos demonstraram que estas células influenciam, de facto, o desenvolvimento destas doenças, nas quais apresentam uma função deficiente.

No caso da Artrite Reumatoide, verificou-se que apesar do aumento do número de células T reguladoras (Tregs) nos locais de inflamação, esta persiste, sugerindo a existência de um compromisso a nível da função das Tregs. Confirmou-se efetivamente que estas células apesar de apresentarem capacidade para suprimir a proliferação de células T efectoras são, contudo, incapazes de suprimir a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  ou a IL-6.

Apesar de se apresentarem como células com um enorme potencial terapêutico ao abrirem a possibilidade de obter Tregs antigénio-específicas, ultrapassando assim os riscos da imunossupressão sistémica, existem ainda vários aspetos que necessitam de maior investigação. Uma das grandes dificuldades verificadas diz respeito à manipulação destas células pelo facto de não serem ainda conhecidos marcadores totalmente específicos. São necessários mais estudos que permitam avaliar a manipulação das Tregs em humanos, bem como determinar quais as condições que poderão influenciar o seu comportamento e conseqüentemente a sua viabilidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** sistema imune, células T reguladoras (Tregs), tolerância imunológica, inflamação, autoimunidade, Artrite Reumatoide.

# ABSTRACT

---

This work aims a literature review about the main advances in knowledge of the mechanisms of action of regulatory T cells and their role in patophysiothology of autoimmune diseases.

Regulatory T cells represents a small T cell population, playing a key role in immune tolerance. Some studies have shown the influence of these cells in the development of autoimmune diseases, which exhibit an impaired function.

It was found in Rheumatoid Arthritis that inflammation persists despite the increased number of Tregs at the site of inflammation. This suggests that there is a compromised regulatory T cell function.

Despite the ability to suppress the proliferation of effector T cells, Tregs cells are unable to suppress the production of inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  or IL-6.

Although they are cells with a large therapeutic potential, opening the possibility to obtain antigenic specific Tregs and this way overcoming the risks of systemic immunosuppression, there are still several issues that need further investigation. One of the biggest problem is the lack of specific markers which difficult Tregs manipulation.

**KEY WORDS:** immune system, regulator T cells (Tregs), immune tolerance, inflammation, autoimmunity, rheumatoid arthritis

# MATERIAIS E MÉTODOS

---

A revisão bibliográfica de artigos realizada foi feita segundo o modelo dos 5S de Haynes, (1) tendo sido utilizadas as bases de dados PubMed e o índice de Revistas Médicas Portuguesas.

A pesquisa foi feita utilizando os termos MeSH (*Medical Subject Headings*) “regulatory T lymphocytes”, “autoimmune diseases”, “rheumatic diseases”, “rheumatoid arthritis” seguida de pesquisa em texto livre, bem como os termos “autoimmunity”, “therapeutic strategies”, “Foxp3 and regulatory T lymphocytes”, “TNF- $\alpha$  and regulatory T lymphocytes”, “IL-6 and regulatory T lymphocytes”. Nesta revisão foram incluídos artigos de revisão e estudos experimentais, nos quais foram feitos ensaios *in vitro* e ensaios *in vivo*, utilizando modelos animais. Além disso foram também consultados livros e as normas da Direção Geral de Saúde.

A pesquisa, feita entre maio de 2014 e março de 2015, incluiu artigos em língua portuguesa e língua inglesa publicados entre 2000 e 2015, tendo sido selecionados um total de 89 artigos.

# INTRODUÇÃO

---

As células T reguladoras (Tregs) correspondem a uma subpopulação minoritária de células T que possui a capacidade de induzir supressão das células T efectoras. São, deste modo, células que desempenham um papel fundamental na manutenção da tolerância imunológica, a qual é essencial para que exista uma resposta controlada das células T efectoras aos autoantígenos e sem que daí resulte, em princípio, prejuízo para o indivíduo na proteção contra agentes externos. As Tregs são, de facto, células fundamentais na prevenção da autoimunidade.(2)

Vários estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos no sentido de compreender o papel das Tregs em diversas patologias, nomeadamente no desenvolvimento de doenças autoimunes. Com efeito, a fisiopatologia destas doenças tem despoletado cada vez mais interesse, por se tratarem de doenças crónicas cuja incidência tem vindo a aumentar. (3) Os enormes avanços tecnológicos nos últimos anos, nomeadamente nas áreas da imunologia e da biologia molecular, têm contribuído de forma extraordinária para a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das doenças autoimunes, que apesar de ainda não estarem totalmente claros, têm permitido a identificação de possíveis alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos tratamentos para estas doenças.

As doenças autoimunes englobam mais de uma centena de doenças, de que são exemplos a *Diabetes Mellitus* tipo I, a patologia autoimune da tiróide (Tiroidite de *Hashimoto*) e a Artrite Reumatoide. Esta última constitui, de facto, uma das mais comuns, sendo responsável por uma elevada morbilidade dada a sua evolução altamente incapacitante, com sérias repercussões a nível social e económico. Assim, tendo em conta a sua relevância e também a existência de um vasto número de artigos científicos, por vezes contraditórios, sobre a patologia, é de grande utilidade a realização de uma revisão bibliográfica mais direcionada para esta doença, e em particular para o papel das Tregs na sua fisiopatologia.

A Artrite Reumatoide é uma doença inflamatória crónica de natureza autoimune, na qual as alterações articulares constituem a manifestação clínica predominante. Apesar desta forma de apresentação típica, trata-se de uma doença sistémica, podendo ter manifestações extra-articulares que surgem habitualmente nas fases mais avançadas da doença e que são responsáveis pela elevada morbilidade que lhe está associada.(4)

Apesar de os mecanismos que levam ao desenvolvimento de doenças autoimunes não serem ainda totalmente conhecidos, as células T reguladoras têm ganho cada vez mais relevância nesta área. De facto, têm-se verificado alterações, não só a nível quantitativo, mas também qualitativo e funcional das células T reguladoras em doentes com patologias autoimunes, nomeadamente no caso da Artrite Reumatoide.(5)



Neste sentido, é importante conhecer e compreender de que forma o comportamento e as alterações que ocorrem nesta subpopulação de células T interfere nos mecanismos fisiopatológicos destas doenças, de modo a avaliar a possibilidade de restituir a sua função ou evitar a sua perda e, assim, determinar a existência de um eventual potencial terapêutico ou mesmo preventivo destas células.

De facto, as Tregs são atualmente consideradas componentes essenciais no controlo da resposta imunológica, influenciando a resposta a vários estímulos. Desta forma, um conhecimento mais aprofundado das suas características, uma melhor compreensão do seu mecanismo de ação e do seu papel nestas doenças poderão permitir a sua manipulação, abrindo caminho para a introdução de terapêuticas mais dirigidas. Estas poderiam permitir uma supressão mais específica e, portanto, mais eficaz, com menos efeitos secundários relativamente àquelas que são instituídas atualmente, ao evitar a imunossupressão sistémica.(6)

Por outro lado, apesar disso, tendo em conta a capacidade imunossupressora das células T reguladoras, é ainda fundamental avaliar a eventualidade de poderem originar também um compromisso do desenvolvimento da resposta imunitária na presença de agentes potencialmente patogénicos, aumentando, por exemplo, a suscetibilidade a infeções ou ao aparecimento de neoplasias.

Pretende-se com este trabalho uma revisão bibliográfica dos principais avanços nesta área nomeadamente a nível do conhecimento e compreensão do mecanismo de ação destas células e do seu papel na fisiopatologia das doenças autoimunes, particularmente da Artrite Reumatoide. Para além disso, pretende-se ainda analisar a viabilidade da manipulação das células T reguladoras e a sua utilização como eventual alvo terapêutico futuramente nestas doenças, tendo por base o que tem sido descrito na literatura.

# CÉLULAS T REGULADORAS

---

## Definição

O sistema imune é um sistema de defesa que tem como função primordial a proteção do organismo contra agentes externos, sendo responsável pela manutenção da sua integridade, a qual é possível através do reconhecimento balanceado dos autoantígenos (*self*) e da resposta contra o *non-self*.(7)

A imunidade comporta um componente específico e um componente inespecífico. O último corresponde à imunidade inata, da qual fazem parte os fagócitos, responsáveis pelo reconhecimento das células *self* no caso de estas estarem danificadas ou envelhecidas, e as células *natural killer* que possuem recetores inibitórios que as impedem de destruir as células *self*. Por outro lado, o componente específico é representado pela imunidade adaptativa, cujos principais agentes celulares são os linfócitos. Estes podem desenvolver reatividade contra os antígenos *non-self*, enquanto alguns sob determinadas condições podem reagir contra as próprias células. A manutenção da tolerância ao *self* está dependente dos mecanismos de tolerância imunológica.(8, 9)

De facto, a tolerância imunológica é um processo que permite que, desde o desenvolvimento mais precoce e ao longo da vida, haja uma resposta controlada a determinados antígenos, nomeadamente autoantígenos (*self*), fundamentais na prevenção do desencadeamento de autoimunidade. Pode ocorrer por dois mecanismos fundamentais: mecanismo central e mecanismo periférico. (10, 11)

O mecanismo central, designado por deleção clonal desenvolve-se no timo, onde ocorre eliminação das células autorreativas<sup>1</sup>, no entanto, algumas delas escapam a este mecanismo e migram até à periferia. Neste caso é fundamental a atuação dos mecanismos de tolerância periférica que permitem a inativação destas células, prevenindo, desta forma, o desenvolvimento de doenças autoimunes. Esta é uma das razões pelas quais apenas um pequeno número de indivíduos desenvolve patologia autoimune. Um dos mecanismos de tolerância periférica mais conhecidos é desempenhado pelas células T reguladoras (Tregs). (12)

De facto, as células T reguladoras são uma subpopulação de linfócitos T que possui a capacidade de induzir supressão das células T efectoras em resposta à presença de autoantígenos ou mesmo a determinados antígenos ambientais.(12)

---

<sup>1</sup> Células capazes de reagir contra os autoantígenos (*self*). Inclui linfócitos B e linfócitos T

Em 1995 foram descritas pela primeira vez por *Sakaguchi et al* (10) como células com capacidade supressora, tendo sido demonstrado que a sua deficiência estaria na origem do aparecimento de determinadas patologias de natureza autoimune. Com efeito, verificou-se que a transferência de uma população de células T desprovidas de Tregs para ratos após timectomia, levava ao desenvolvimento de uma variedade de doenças autoimunes. Por outro lado, no grupo ao qual se administrou de seguida células T reguladoras, foi possível prevenir o desenvolvimento destas doenças.(10)

As células T reguladoras poderão constituir assim elementos fundamentais no controle do desenvolvimento de doenças autoimunes, bem como no processo envolvido na rejeição de transplantes, desempenhando um papel fulcral na tolerância aos aloantígenos. São ainda responsáveis pela regulação da resposta imunitária no contexto de algumas doenças alérgicas. (13)

## Caracterização

As células T reguladoras podem ser divididas em vários subgrupos, tendo em conta moléculas que expressam à sua superfície e a produção de citocinas, não existindo contudo marcadores específicos capazes de as caracterizar fenotipicamente.

Tendo por base o local de origem das células T reguladoras, podemos considerar dois subgrupos : as *natural* Tregs (nTregs) e as *induced* Tregs (iTregs). A nTregs, têm origem no timo, enquanto que as iTregs desenvolvem-se a partir de linfócitos T maduros em resposta à presença de determinados estímulos antigénicos. (11)

### *Natural Tregs*

---

As *natural* Tregs (células T  $CD4^+CD25^+$  ) são células anérgicas e com baixa capacidade de proliferação que têm origem no timo, sendo posteriormente lançadas na circulação periférica. Estas células constituem uma população de linfócitos T com um papel importante na prevenção da ocorrência de autoimunidade, uma vez que são capazes de suprimir as células T autorreactivas que escapam ao mecanismo de tolerância central.(10, 14)

Estima-se que o fenótipo  $TCD4^+CD25^+$  seja expresso por apenas 1 a 2% das células T presentes no sangue periférico.(10) As Tregs  $CD4^+CD25^+$  constituem, contudo, a população dominante de células T reguladoras, tendo sido demonstrada a sua importância na prevenção do desenvolvimento de autoimunidade quando transferidas para modelos animais sujeitos a timectomia. (14) Um dos modelos que demonstrou esta

capacidade tem já vários anos e foi realizado por *Sakaguchi et al* que verificou que ratos sujeitos a timectomia ao 3º dia do período neonatal estariam predispostos ao desenvolvimento várias doenças autoimunes, nomeadamente tiroidite, Diabetes Mellitus (DM) e gastrite autoimune, no entanto, era possível prevenir a ocorrência destas doenças através da transferência de células T de ratos saudáveis, capacidade que foi atribuída ao fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.(15)

Uma das grandes dificuldades com que se deparam os investigadores é encontrar um marcador específico que permita identificar funcionalmente esta subpopulação de linfócitos T. Inicialmente, estudos apontavam para o CD25<sup>+</sup><sup>2</sup> como um marcador funcional útil na identificação das nTregs, (16) no entanto, ele também é expresso pelos linfócitos T efectores ativados, o que significa que a caracterização das células com recurso ao fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> não as representa fidedignamente, constituindo uma população “pouco pura” de células T reguladoras. (17). No entanto, a literatura tem sido consensual na utilização deste marcador para a caracterização fenotípica destas células, associado porém a outros que tornassem a fenotipagem mais fidedigna. Assim, para além do CD25<sup>+</sup> outros marcadores têm sido associados às nTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, nomeadamente o Foxp3, CD103, CD127, CTLA-4, GITR ou TNFR-2.

O fator de transcrição intracelular Foxp3 – *forkhead box protein 3* – é expresso pelas nTregs, sendo considerado um regulador major da sua formação e também do desenvolvimento da sua capacidade supressora. Efetivamente, estudos demonstram que o fator de transcrição Foxp3 atua através da formação de um complexo com o NFAT<sup>3</sup>, que é um regulador comum da ativação das células T efectoras e das Tregs, sendo assim responsável pelo controlo de dois mecanismos antagónicos: a ativação celular e a tolerância imunológica. De facto, o NFAT ao ligar-se à proteína ativadora 1 (AP-1)<sup>4</sup> promove a proliferação de células T efectoras. Por outro lado, ao formar um complexo com o Foxp3 leva à diferenciação de células T reguladoras. Pensa-se que existirá uma competição entre o Foxp3 e a AP-1 pela ligação ao NFAT.(18, 19)

A existência de uma mutação no gene Foxp3 está muitas vezes associada ao desenvolvimento de patologias autoimunes. (20) De facto, está descrita a associação entre esta mutação e o desenvolvimento de uma síndrome autoimune designado por IPEX<sup>5</sup>, que se caracteriza por uma intensa inflamação da pele e do sistema gastrointestinal, tiroidite, diabetes insulino dependente e elevadas concentrações séricas de autoanticorpos. (16, 21) Kim J-R, num estudo em que pretendia avaliar a diferença entre as Tregs presentes no sangue periférico de indivíduos saudáveis e as Tregs de doentes com doenças autoimunes, como a Artrite Reumatoide ou a doença de Beçhet verificou que, apesar de não existirem diferenças significativas na quantidade de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> entre os dois grupos, as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> estavam significativamente diminuídas no grupo de pacientes com doença. (22). Desta forma, o Foxp3 poderia ser utilizado como um

---

<sup>2</sup> CD: *Cluster of differentiation*

<sup>3</sup> *Calcium-regulated transcription factor*

<sup>4</sup> Fator de transcrição, regulador da expressão genética.

<sup>5</sup> *Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked Syndrome*

marcador mais fidedigno que o CD25 na identificação das Tregs. Trata-se, contudo, de um fator de transcrição também expresso por algumas células T efectoras, limitando assim a sua utilização como marcador das células T reguladoras.

Outro dos marcadores usados na identificação das Tregs é o CTLA-4 (*Cytotoxic lymphocyte associated Antigen-4*), o qual exerce um papel importante na função destas células, estimulando e aumentando a sua capacidade supressora, sendo que a sua quantificação pode constituir um indicador do estado funcional das células T reguladoras. (16) De facto, num estudo que utilizou um modelo de colite autoimune, verificou-se que a administração de anti-CTLA-4 levava ao desenvolvimento de colite, apesar da presença do elevado número de Tregs Foxp3<sup>+</sup>, identificadas por imunohistoquímica, sugerindo assim que a utilização de terapêutica anti-CTLA4 levava ao comprometimento da função supressora das Tregs. (23, 24)

Adicionalmente, num estudo realizado em pacientes com melanoma metastizado tratados com anti-CTLA4 humanizado, considerado eficaz no controlo da doença tumoral, verificou-se em cerca de 20% dos doentes o desenvolvimento de doenças autoimunes, nomeadamente enterocolite, sugerindo assim a influência do CTLA-4 na função supressora das Tregs. (24) Estes resultados levantam, porém, a questão da necessidade de ponderar os prós e os contras da aplicação de uma terapêutica anti-CTLA4.

O CTLA-4, porém, é também expresso pelas células T ativadas, no entanto, exerce nestas células uma função de inibição, divergindo assim daquela que desempenha sobre a população de células T reguladoras. (6)

O CD103 é também referido na literatura como um possível marcador das nTregs(10) Com efeito, estudos revelaram que a percentagem de células que expressam CD103 é significativamente superior entre as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> do que nas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. (25) Porém este marcador é também expresso por outras células, nomeadamente células T CD8<sup>+</sup>, células dendríticas e mastócitos. São necessários mais estudos para verificar qual o seu papel sobre a função das Tregs.(16)

O CD127 tem sido usado em ensaios laboratoriais para a distinção entre as Tregs e as células T efectoras CD25<sup>+</sup>, portanto células T efectoras ativadas. Vários estudos comprovaram que a subpopulação de células Tregs apresentam uma baixa expressão de CD127 (CD127<sup>low</sup>), enquanto as células T efectoras CD25<sup>+</sup> possuem uma elevada expressão deste marcador (CD127<sup>high</sup>). (26) Esta diferença de expressão faz desta molécula um bom marcador fenotípico desta população.

O GITR – *glucocorticoid-induced tumor necrosis fator* – foi referido em vários estudos como um regulador negativo da função das Tregs, inibindo a sua função supressora.(27) No entanto, estudos mais recentes têm sugerido que a ausência de expressão de GITR pelas Tregs poderá contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade. De facto, foi demonstrado que a transferência de timócitos desprovidos de GITR para ratos sujeitos a timectomia levava ao desenvolvimento de diversas doenças,

nomeadamente colite e hepatite autoimunes. Apesar disso o GITR é também expresso por células T efectoras, embora em muito menor quantidade, pelo que poderá constituir um marcador útil na identificação das Tregs. (28, 29)

Estudos realizados demonstraram que o TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Fator alfa*), uma citocina pró-inflamatória, poderá contribuir para a proliferação e ativação das células T reguladoras, através do recetor TNFR-2. De facto, em estudos realizados em modelos animais tem-se verificado que a estimulação do recetor TNFR-2 poderá levar à formação e expansão de uma população Tregs.(30) Este recetor é expresso em muito menor quantidade que o recetor TNFR-1, possuindo uma expressão mais restrita. Assim, as Tregs poderão constituir células com potencial capacidade supressora, sendo que este recetor poderá inclusivamente constituir um potencial alvo terapêutico. Este recetor é também expresso pelas iTregs, no entanto, não é expresso pela maioria das células T efectoras. Desta forma, em associação com outros marcadores fenotípicos, o recetor TNFR-2 pode ser muito útil na identificação das células T reguladoras em ensaios laboratoriais. (16)

Outro dos marcadores que poderá ser utilizado para a identificação das Tregs é a expressão do ligando da L-selectina CD62L pelas nTregs. De facto, num estudo em que se utilizou um modelo de doenças autoimunes do Sistema Nervoso Central (SNC) verificou-se que durante as fases de remissão da doença havia acumulação de Tregs CD62L<sup>high</sup> que expressam grandes quantidades de CTLA-4 e TGF- $\beta$ .(31)

Recentemente, foi identificado o fator de transcrição *Helios* que tem demonstrado implicações na função das Tregs, nomeadamente na ligação e regulação da expressão de Foxp3 que, como já foi anteriormente referido, é um componente essencial na sua função. Este marcador é expresso maioritariamente pelas nTreg mas não pelas iTreg. (26) Desta forma, poderia ser útil na distinção entre estas duas subpopulações de Tregs, no entanto, apesar destas evidências, atualmente ainda não existe nenhum marcador ideal que permita distinguir inequivocamente estes dois subtipos de células. (32)

Marcador	Referência	Observações/Achados
CD25+	<i>Chen et al(16), Read S. et al(17)</i>	Expresso pela maioria das Tregs.
Foxp3	<i>Gambineri et al(21)</i> <i>Kim, J.R et al(22)</i>	Mutação no gene Foxp3 associada a doenças AI; ↓ Em indivíduos com doenças AI.
CTLA-4	<i>Watanabe et al(23)</i>	Anti-CTLA-4 levou ao desenvolvimento de colite num modelo de colite autoimune.
CD103	<i>Allakhverdi et al(25)</i>	› Expressão pelas células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> que pelas CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> .
CD127	<i>Chavele et al(26)</i>	Tregs: ↓ expressão de CD127 (CD127 <sup>low</sup> ); Células T efectoras: ↑ expressão de CD127 (CD127 <sup>high</sup> ).
GITR	<i>Liao et al(29), Petrillo et al(28)</i>	Ausência de GITR → desenvolvimento de doenças AI.
TNFR-2	<i>Faustman et al(30)</i>	Estimulação de TNFR-2 → formação e expansão de Tregs.
CD62L	<i>Lange et al(31)</i>	Remissão de doenças AI do SNC → acumulação de Tregs CD62L <sup>high</sup> .
<i>Helios</i>	<i>Chavele et al(26)</i>	Expresso pelas nTregs mas não pelas iTregs.

**Tabela 1:** Principais marcadores das Células T reguladoras. Abreviaturas: AI :autoimunes

### *Induced Tregs*

Como as nTregs são muito difíceis de manipular devido ao seu reduzido número e ao facto da sua cultura prolongada levar a uma diminuição da sua atividade supressora, houve necessidade de desenvolver estudos no sentido de encontrar uma subpopulação de células T reguladoras cuja manipulação fosse mais fácil. (33)

As *induced* Tregs (iTregs) são células T que têm, à semelhança das nTregs, capacidade supressora, no entanto, têm origem nos órgãos linfoides periféricos a partir das células T *naive* (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) em resposta à estimulação antigénica. Estas células

podem também ser originadas *in vitro* a partir das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> sob determinadas condições. (33) Por exemplo, é possível induzir a expressão do Foxp3 *in vitro* a partir dos linfócitos T *naive* isolados dos órgãos linfoides secundários ou do sangue periférico na presença de TGF- $\beta$  e IL-2. (32)

O TGF- $\beta$  desempenha um papel fundamental na promoção da indução do fator de transcrição Foxp3. Relativamente à IL-2, ela representa funções diferentes *in vitro* e *in vivo*. Assim, *in vitro* e à semelhança do que acontece com o TGF- $\beta$ , é importante na formação das iTregs. Por outro lado, relativamente à sua atividade *in vivo*, não existe grande conhecimento quanto ao papel desempenhado pela IL-2 na indução das iTregs, no entanto, sabe-se que contribui para a proliferação e sobrevivência destas células.(32)

Relativamente à geração de iTregs *in vivo*, a partir de células T *naive* têm sido relatados vários métodos, sendo que, regra geral, todas as células apresentadoras de antígenos (APC) têm capacidade para induzir esse processo. Existem, contudo, outras células com a mesma capacidade, das quais são exemplo os linfócitos B ou as células estaminais mesenquimatosas.(33)

Existem ainda outras células T reguladoras que não expressam Foxp3 (Foxp3-) mas que possuem igualmente a capacidade de suprimir a resposta inflamatória, nomeadamente as células Tr1 (*Type 1 regulatory*) e as Th3 (*T helper 3*).

As células Tr1 produzem essencialmente IL-10, sendo a sua capacidade supressora dependente desta citocina. Apesar da reduzida capacidade de proliferação, estudos demonstraram que estas células poderão ser muito úteis na prevenção de algumas doenças autoimunes.(34, 35)

As células Th3 produzem elevadas quantidades de TGF- $\beta$ , havendo dados que demonstram a sua capacidade para suprimir o desenvolvimento de doenças autoimunes *in vitro*, nomeadamente a encefalite autoimune.(34)

Apesar de as nTregs e as iTregs apresentarem capacidade supressora semelhante, alguns estudos têm demonstrado que as nTregs não são estáveis na presença de um ambiente inflamatório, podendo, na presença de IL-6, transformarem-se num fenótipo Th17, responsável pela perpetuação da inflamação.(36)

## Mecanismo de ação

Independentemente de se tratarem de *natural* ou *induced* Tregs, as células T reguladoras possuem caracteristicamente uma função supressora essencial para a manutenção da tolerância imunológica.



Os mecanismos de ação das células T reguladoras não ainda estão totalmente esclarecidos, sendo várias as controvérsias sobre esta temática, no entanto, atualmente considera-se que poderão atuar por diversos mecanismos que podem ser resumidos a três grandes categorias:

- a) Contacto célula a célula através das moléculas de superfície;
- b) Através da libertação de citocinas;
- c) Através de disrupção metabólica das células T efectoras;

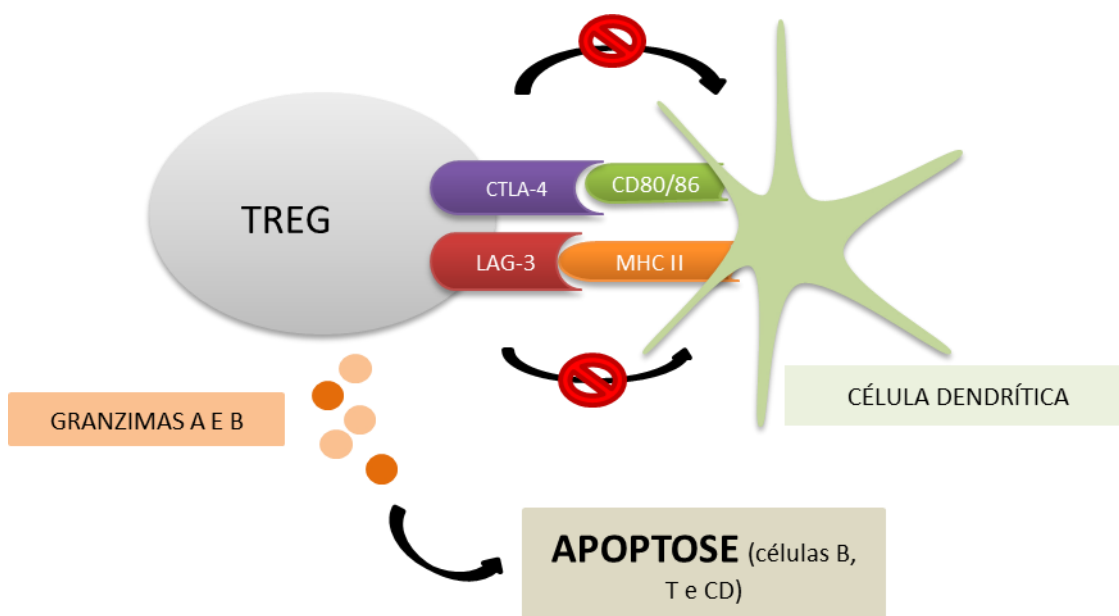
Relativamente ao mecanismo dependente do contacto célula a célula, ele ocorre fundamentalmente através de duas moléculas: o CTLA-4 e o LAG-3 (figura 1). (32)

O CTLA-4 é uma molécula inibitória que se liga com grande afinidade às moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 das células dendríticas, competindo com o CD28 e inibindo a ação das células T efectoras.

Esta molécula pode, no entanto, atuar por dois mecanismos distintos. Por um lado, pode ligar-se com grande afinidade às moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 das células dendríticas, inibindo a ação dos linfócitos T efectores, por inibição do 2º sinal de ativação dos linfócitos T (sinal coestimulatório). Por outro lado, pode atuar indiretamente através da modulação da função das células apresentadoras de antígenos (APC), conferindo-lhes capacidade tolerogénica. (6) Estudos têm demonstrado que o bloqueio do CTLA-4 pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes, uma vez que há uma redução da supressão das células T efectoras. (10, 26)

A proteína transmembranar LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) expressa pelas células T CD4+, T CD8+, células T reguladoras e células *natural killer* (NK) tem sido também implicada na função supressora das células T reguladoras, tendo à semelhança do CTLA-4, duas vias de atuação: uma através do contacto direto entre as Tregs e as células T efectoras e outra através da modulação das APC. Em ambos os casos o LAG-3 liga-se ao MHC de classe II, inibindo a maturação das células dendríticas. (16, 37)

Podem ainda incluir-se neste grupo as moléculas citotóxicas produzidas pelas Tregs, como as granzimas A e B, uma vez que requerem o contacto célula a célula. Estas moléculas poderão contribuir para a indução da apoptose de algumas células envolvidas na resposta inflamatória, como as células B, os monócitos ou as células dendríticas, contribuindo assim para a função supressora das Tregs. (10, 32) Este processo também pode ser designado por citólise. Estudos mostraram um aumento da expressão de granzima B em murinos na presença de células T reguladoras ativadas, sendo que a deficiência desta molécula está associada a uma diminuição da capacidade supressora das Tregs.(38)



**Figura 1: Representação esquemática da supressão mediada pelo contacto célula a célula:** A supressão mediada pelo contacto célula-célula ocorre através da ligação dos recetores das Tregs, como o CTLA-4 e o LAG-3 com as moléculas CD80/86 e o MHC II, respetivamente, das células dendríticas. Adicionalmente, a libertação de granzimas A e B pelas Tregs induz apoptose das células dendríticas e também das células B e T ativadas. *Abreviaturas:* CTLA-4: *Cytotoxic lymphocyte associated Ag-4*; LAG-3: *Lymphocyte-activation gene 3*; MHC II: Marcador de histocompatibilidade de classe II (Adaptado de Schmitt E., et al (32))

Já no que diz respeito à interação entre células através de citocinas inibitórias e não diretamente célula-célula (figura 2), a IL-10, a IL-35 e o TGF- $\beta$  têm sido apontadas como elementos com um papel relevante na função supressora das Tregs, nomeadamente no controlo da ativação das células apresentadoras de antígenos. De facto, estas células possuem um importante potencial imunorregulador, controlando a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , a IL-2 ou o IFN- $\gamma$  pelas APC. Podem também atuar inibindo diretamente a proliferação de células T, (17, 32) no entanto o mecanismo através do qual a IL-10 exerce supressão direta das células T não é ainda totalmente conhecido. Estudos sugerem que esta citocina iniba a expressão de CD2<sup>6</sup> através do SHP-1<sup>7</sup>, inibindo assim a proliferação das células T efectoras. (39)

O papel da IL-10, uma citocina que apesar de não ser ubíqua é uma das principais citocinas produzidas pelas Tregs, na função supressora das Tregs evidencia-se pela existência de estudos que demonstram que, a inativação da IL-10 ou defeitos no seu recetor (IL-10R) pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias, como por exemplo a doença inflamatória intestinal. (40) Esta citocina afeta a diferenciação das células dendríticas, inibindo assim a ativação das células T (26) e portanto a sua função primordial na imunidade mediada por células.

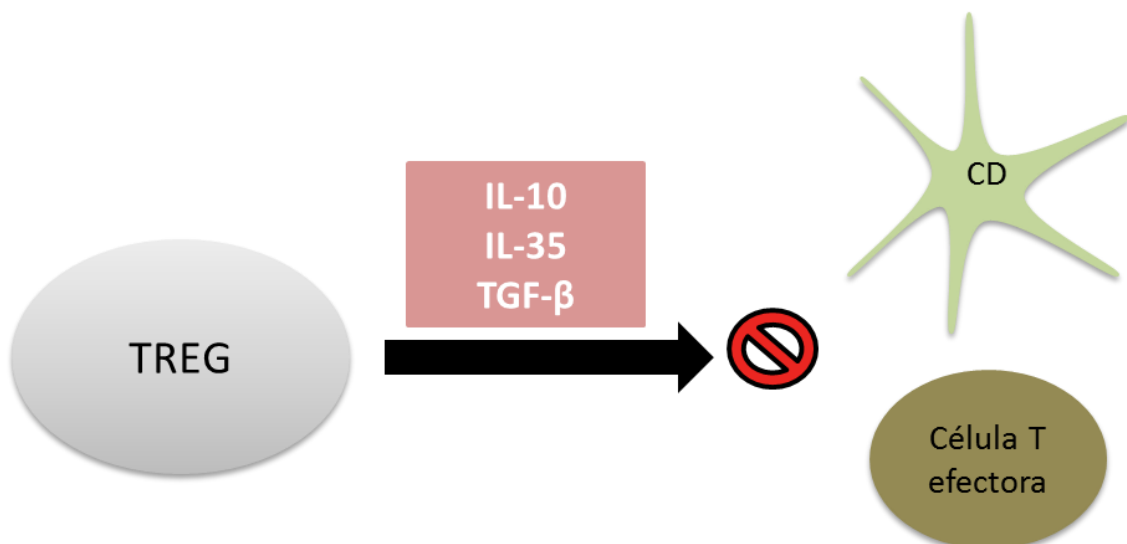
<sup>6</sup> A estimulação via CD2 induz ativação e proliferação das células T.

<sup>7</sup> *Src homology region 2 domain containing phosphatase-1* (SHP-1)

O TGF- $\beta$ , à semelhança da IL-10, parece também estar envolvido, não só no desenvolvimento das Tregs através da indução da expressão de Foxp3, mas também na função reguladora das células T reguladoras. De facto, num dos estudos, em que um grupo de murinos foi injetado com o anticorpo anti-TGF $\beta$  e outro com células apresentadoras de antígenos pré-tratadas com TGF- $\beta$ , apenas o último grupo foi capaz de suprimir uma reação de hipersensibilidade retardada, o que sugere que o TGF- $\beta$  poderá ter um papel importante no desenvolvimento das células T reguladoras(41).

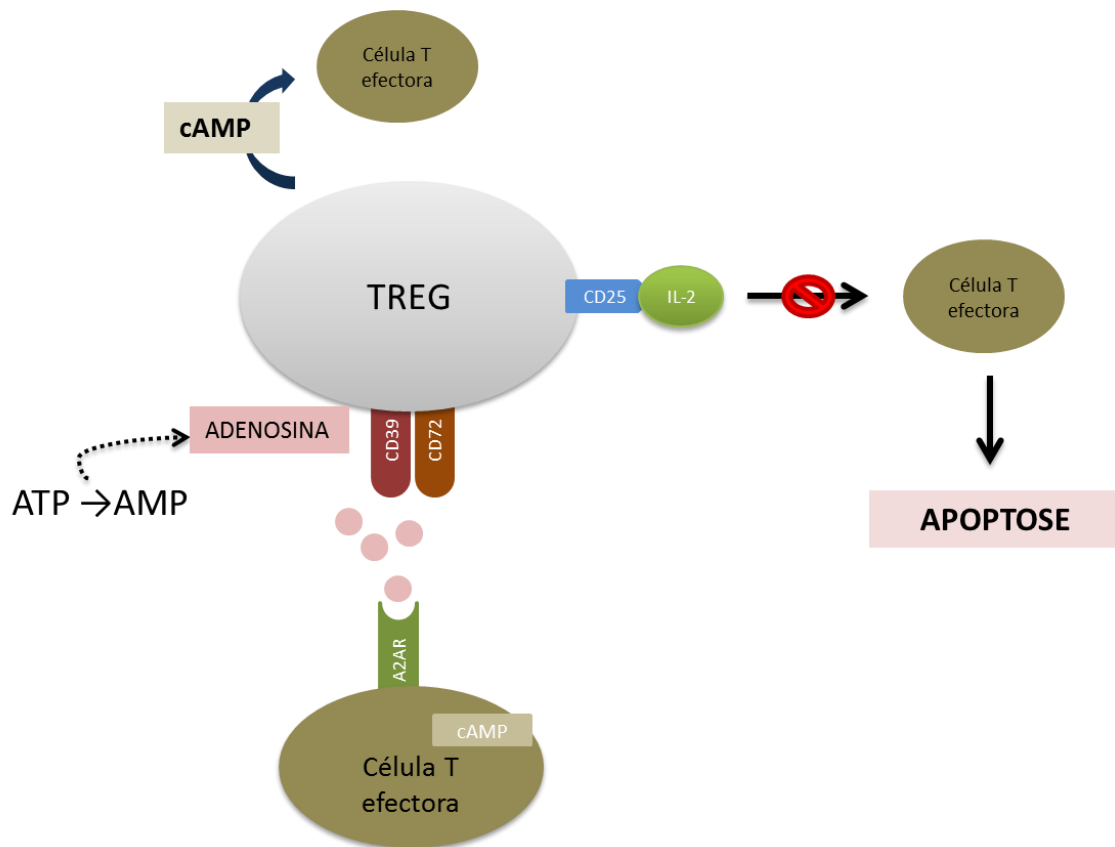
A expressão de TGF- $\beta$  pelas Tregs pode ser aumentada *in vitro* através da administração de anti-CD3 (26). De facto, estudos realizados em murinos com *Diabetes Mellitus* tipo I demonstraram que o tratamento com o anticorpo anti-CD3 levou a um aumento do número de células T reguladoras e a uma melhoria da sua função, no entanto, a administração concomitante de um anti-TGF $\beta$  era capaz de reverter todos estes efeitos, o que apoia a hipótese de que o anti-CD3 atua via TGF- $\beta$ (2).

Mais recentemente, a IL-35 foi identificada como uma citocina com possíveis implicações na função reguladora das Tregs, atuando na regulação nas células T efectoras, bem como na expansão das Tregs através da indução de Foxp3. (10, 32, 38) Além disso, poderão ainda levar ao desenvolvimento de Tregs Foxp3- cuja função reguladora é dependente de IL-35. De facto, estudos demonstram que o tratamento de células T *naive* com IL-35 é capaz de induzir a formação de uma nova população de células T reguladoras que não expressam Foxp3 e cuja atividade supressora é dependente de IL-35. São, no entanto, necessários mais estudos para determinar com maior segurança a sua eventual utilidade terapêutica.(42)



**Figura 2: Representação esquemática do efeito da secreção de citocinas inibitórias pelas Tregs:** As células T reguladoras libertam citocinas, como a IL-10, o TGF- $\beta$  e a IL-35 que inibem as células dendríticas e as células T efectoras. Abreviaturas: IL-10: Interleucina 10; IL-35: Interleucina 35; TGF- $\beta$ : *Tumor Growth Factor*  $\beta$ ; CD: Célula dendrítica (*Adaptado de Schmitt E., et al (32)*).

Por fim, a ruptura metabólica (figura 3) é outro dos mecanismos de supressão, pensando-se atualmente que poderá incluir três vias distintas: a apoptose resultante da privação de IL-2 (considerada um fator de crescimento das células T), a inibição mediada por AMP cíclico (cAMP) ou a imunossupressão mediada pelo recetor A2 de adenosina (A2AR) produzida por CD39 e CD73. Com efeito, estudos sugerem que a expressão de CD25 pelas Tregs faz com que estas consumam IL-2 que, desta forma, fica menos disponível para as células T efectoras que necessitam dela para conseguirem sobreviver. Relativamente às ectoenzimas CD39 e CD73 das Tregs, estas hidrolisam o ATP ou o ADP a adenosina monofosfato (AMP), que vai inibir as células T efectoras ao ativar o recetor A2 da adenosina. (26, 32, 38)



**Figura 3: Representação esquemática do processo de ruptura metabólica:** A ruptura metabólica das células T efectoras pode ser mediada por cAMP, pelo recetor A2 de adenosina produzida por CD39 e CD73 e pelo consumo de IL-2 que induz apoptose das células T. Abreviaturas: ATP: Adenosina trifosfato; AMP: Adenosina Monofosfato ; cAMP: Adenosina Monofosfato Cíclico *Adaptado de Schmitt E., et al (32)*

# DOENÇAS AUTOIMUNES

---

## Definição

As doenças autoimunes englobam um largo espectro de doenças, cuja incidência tem vindo a aumentar nos últimos anos, com sérias repercussões não só a nível de morbilidade e mortalidade como também a nível socioeconómico, uma vez que são doenças crónicas para as quais não existe uma cura propriamente dita. A causa desta tendência é desconhecida, (43) ainda que sejam sugeridas algumas possíveis causas, nomeadamente o aumento da exposição a determinados poluentes ou as alterações a nível da dieta, principalmente entre os países desenvolvidos. Por outro lado, poderá ainda ser devida à melhoria dos métodos de deteção.

Estima-se que cerca de 5% da população mundial venha a desenvolver uma doença autoimune, atingindo maioritariamente mulheres em idade fértil. Contudo, nos homens estas doenças geralmente surgem mais tardiamente, possuindo uma evolução mais desfavorável, sendo estes mais suscetíveis ao aparecimento de complicações. (44)

São doenças caracterizadas pelo desenvolvimento de uma resposta imune contra os próprios tecidos, podendo levar à sua destruição, sendo que a sua etiologia não está ainda bem esclarecida. De facto, o sistema imune tem um papel muito importante na sobrevivência, sendo fundamental na proteção contra infeções ou até mesmo no desenvolvimento de neoplasias. Contudo, sob determinadas condições ainda não totalmente conhecidas, pode ocorrer uma quebra da tolerância imunológica, levando a uma resposta exagerada do sistema imune que, ao reagir contra as próprias células e tecidos, é capaz de produzir doença.(9)

Apesar de não existir uma associação inequívoca com uma etiologia específica, as doenças autoimunes são consideradas multifatoriais, podendo estar relacionadas com fatores genéticos, imunológicos ou ambientais, nomeadamente infeções e fatores hormonais.(45)

Uma das hipóteses apontadas é efetivamente a etiologia infecciosa, que poderá despoletar o desenvolvimento de autoimunidade em indivíduos geneticamente predispostos, acreditando-se assim que o desenvolvimento de doenças autoimunes poderá resultar da interação entre fatores ambientais e alguma suscetibilidade genética. (46) Alguns fatores ambientais relacionados são o tabaco e a exposição à sílica e a determinados solventes. (47)

A hipótese infecciosa poderá ser explicada pelo facto de os agentes infecciosos poderem possuir determinadas características estruturais semelhantes aos antigénios de

determinados órgãos ou tecidos do próprio organismo (*self*), levando ao desenvolvimento de uma reação autoimune contra os mesmos. Este processo é designado por mimetismo molecular. (46) Um dos exemplos que apoia esta hipótese é o caso da febre reumática, na qual existe uma reação cruzada entre o *Streptococcus* e o tecido cardíaco. (45)

Diversos fatores ambientais, como a exposição ao tabaco e a radiações ou mesmo a dieta, têm sido associados a um aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças autoimunes, estando associados ao aparecimento de alterações epigenéticas que poderão influenciar a função das células do sistema imune. De facto, alguns fatores ambientais podem inclusivamente causar alterações ao nível da metilação do DNA. (46)

Relativamente à hipótese genética, mutações no gene PTPN22<sup>8</sup>, envolvido na ativação das células T, tem sido associado a um aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças autoimunes. (48) Além disso, mutações nos genes *HLA* poderão também estar na origem de diversas patologias de natureza autoimune, como a Diabetes *Mellitus* tipo I e a Espondilite Anquilosante. (45)

Para além disso, tendo em conta as diferenças de incidência entre géneros já mencionadas, a suscetibilidade ao desenvolvimento de autoimunidade poderá ainda ser influenciada por questões hormonais, sendo que alguns estudos têm sugerido que os estrogénios e a prolactina constituem fatores de suscetibilidade, enquanto que os androgénios conferem proteção. (44) Efetivamente, em determinadas condições, estas duas primeiras hormonas sexuais são capazes de ativar células B autorreativas. (47)

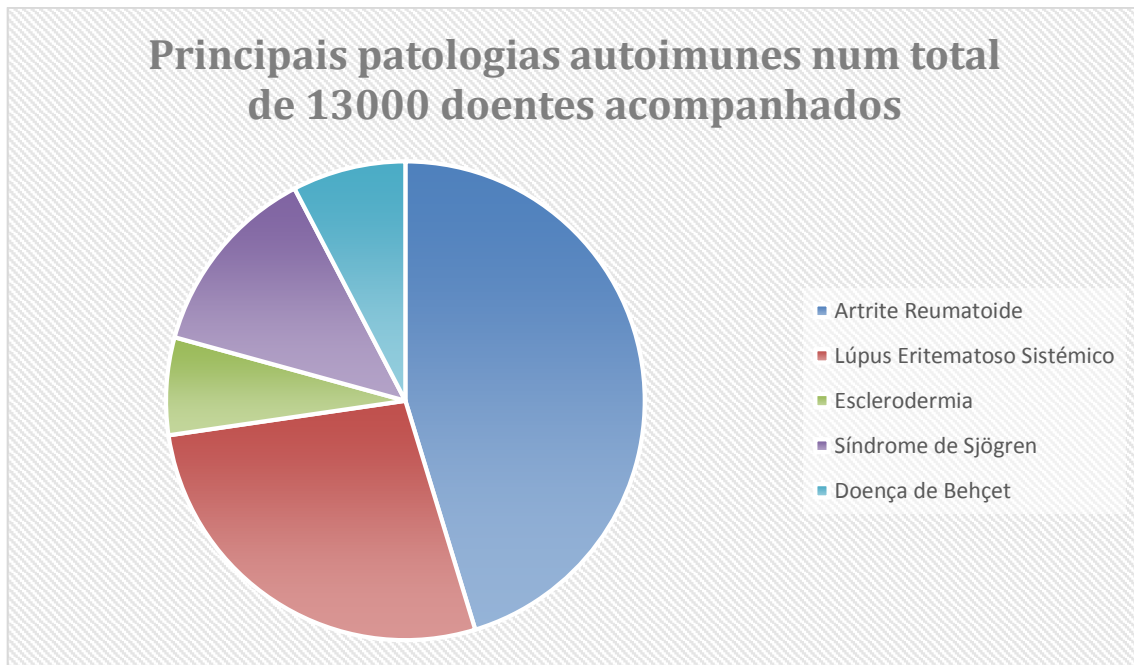
Alguns estudos sugerem ainda uma associação com fatores psicológicos, nomeadamente com o distúrbio de stress pós-traumático. Tem sido sugerido que o stress poderá alterar as vias neuroendócrinas, provocando desequilíbrios a nível da resposta imune, podendo levar consequentemente ao desenvolvimento de autoimunidade. (49)

Num estudo realizado por *Jacobson et al* em 1997, que analisou a epidemiologia das principais doenças autoimunes numa população dos Estados Unidos ao longo de 30 anos (de 1965 a 1995) verificou-se que a sua prevalência era de cerca de 3%, afetando preferencialmente doentes do sexo feminino. Por exemplo, no mesmo estudo, cerca de 85% dos indivíduos com Tiroidite Autoimune, Lúpus Eritematoso Sistémico ou Síndrome de Sjögren eram mulheres. Em doenças como a Artrite Reumatoide ou a Esclerose Múltipla as mulheres constituíam cerca de 60% dos casos. No caso da *Diabetes Mellitus* tipo I não foram encontradas variações significativas entre os géneros. (50, 51)

Em Portugal, não existem dados recentes da epidemiologia das doenças autoimunes, no entanto, num estudo publicado em 2006 que teve como objetivo avaliar o número de doentes com patologia autoimune seguido pelos serviços de Medicina Interna do país, verificou-se que, num total de 6000 a 13000 doentes seguidos, as doenças com maior prevalência eram a Artrite Reumatoide (1181 a 2305 doentes), Lúpus Eritematoso Sistémico (708 a 1395 doentes) e o Síndrome de Sjögren (320 a 665 doentes). (52)

---

<sup>8</sup> *Protein tyrosine phosphatase, non-recetor type 22*



**Gráfico 1:** Principais patologias autoimunes num total de 13000 doentes seguidos nos serviços de Medicina Interna do país, 2006. (52)

## Mecanismos Fisiopatológicos Comuns

O sistema imunológico é um componente essencial à sobrevivência, no entanto, por vezes, é também responsável pelo aparecimento de doença, resultante de uma resposta imune descontrolada que poderá levar ao desenvolvimento de autoimunidade. Esta ocorre devido a uma falha no mecanismo de tolerância imunológica que resulta na ativação de uma resposta imune contra os autoantígenos (*self*).<sup>(9)</sup>

Na verdade, todos os indivíduos possuem células autorreativas, contudo, em indivíduos saudáveis a maioria delas é eliminada ainda no timo. Algumas delas podem, no entanto, migrar até à periferia e, em determinadas condições patológicas, levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes.<sup>(53)</sup>

Foi a partir do final da década de 70 que se verificou que nem todos os linfócitos autorreativos eram eliminados, sendo possível encontrá-los em indivíduos saudáveis, sem que isso condicione necessariamente o desenvolvimento de doença. Nas pessoas saudáveis, a atividade destes linfócitos deverá estar suprimida, no entanto, por vezes há uma quebra da tolerância imunológica que poderá resultar na ativação destas células e no conseqüente aparecimento de doença. (8)

Apesar de os mecanismos específicos que levam ao desenvolvimento de doenças autoimunes não serem ainda totalmente conhecidos, atualmente consideram-se três

mecanismos principais responsáveis pela ativação das células B e T autorreativos: mimetismo molecular, inflamação local e ativação policlonal.

O **mimetismo molecular**, de que é exemplo a Febre Reumática, está relacionado com o facto de alguns agentes infecciosos possuírem moléculas estruturais semelhantes aos autoantígenos, fazendo com que as células T os reconheçam como estranhos. (53)

A **inflamação local** é outro dos mecanismos, leva ao aumento da expressão de moléculas envolvidas no reconhecimento antigénico, podendo estar envolvido na origem de doenças como a *Diabetes Mellitus* tipo I ou a Esclerose Múltipla, ainda que não exista uma correlação bem fundamentada. (53)

Por último, a **ativação policlonal** de células B e T autorreativos, cuja causa é ainda desconhecida, mas que poderá estar na origem de diversas doenças autoimunes(54). De facto, no que diz respeito às células B, estas são capazes de produzir autoanticorpos ou mesmo funcionar como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T autorreativos. Será, portanto, fundamental determinar melhor o papel das células B na patogénia das doenças autoimunes, atualmente menos compreendido do que aquele desempenhado pelas células T. (47)

Existem ainda outros componentes do sistema imune que poderão estar envolvidos nos mecanismos que levam ao desenvolvimento de autoimunidade.

As Tregs, essenciais na manutenção da tolerância imunológica, como já foi mencionado, têm também um papel comprovado no desenvolvimento de doenças autoimunes. Estas células interagem com uma diversidade de outras células nomeadamente células T e células dendríticas, influenciando o seu desenvolvimento e função. Não existem, porém, estudos concordantes no que diz respeito ao número de Tregs existentes em circulação nas doenças autoimunes. De facto, existem estudos que reportam um aumento, outros uma diminuição e ainda outros que não reportam qualquer alteração na frequência das Tregs no sangue periférico de indivíduos com patologia autoimune, como a Artrite Reumatoide, o Lúpus Eritematoso Sistémico ou a Esclerose Múltipla, quando comparados com indivíduos saudáveis.(26, 55, 56) Estas divergências poderão, contudo, ser devidas ao facto de não existir um marcador completamente específico e universal para identificação das Tregs. Não poderemos também esquecer a influência que possa ter o estádio da doença e a estratégia terapêutica adotada. Por outro lado, no que diz respeito à função das Tregs, parece existir um comprometimento dessa função. (57) De facto, as células T reguladoras são influenciadas pelas citocinas presentes nos locais de inflamação, como o TNF- $\alpha$ , a IL-6 ou a IL-1 que, apesar de estimularem a proliferação das Tregs nos locais de inflamação, comprometem a sua função.(57) Estudos demonstram que a adição *in vitro* de elevadas quantidades de TNF- $\alpha$  é capaz de inibir a função supressora das Tregs, através da diminuição da expressão de Foxp3. (58)Existem ainda estudos que apontam para uma resistência das células T efectoras à ação supressora das Tregs, no entanto esta hipótese gera alguma controvérsia. (26, 55) Para verificar se existe resistência das células T efectoras à ação das Tregs ou se, por outro lado, o defeito reside na diminuição da capacidade supressora das células T reguladoras, alguns estudos



isolaram Tregs de pacientes com Artrite Reumatoide colocando-as em cultura com células T efectoras pertencentes a indivíduos saudáveis e o inverso, ou seja, Tregs isoladas de indivíduos saudáveis e células T efectoras de indivíduos doentes. Assim, verificaram que as Tregs pertencentes a indivíduos doentes eram incapazes de inibir a proliferação de células T de indivíduos saudáveis e que, por outro lado, as Tregs pertencentes ao grupo saudável eram capazes de suprimir a proliferação de células T pertencentes ao grupo de doentes. Desta forma, estes estudos apontam para um defeito intrínseco das Tregs e não para a existência de uma resistência por parte das células T efectoras. (55, 59)

As células T *helper* 17 (Th17), um subtipo de células T que em condições normais são úteis na proteção contra infecções, constituem um desses exemplos, acreditando-se que poderão desempenhar um papel primordial na patogenia destas doenças. Estas células têm em comum com as Tregs o facto de serem ambas dependentes da presença de TGF- $\beta$ , sendo que a combinação deste com citocinas inflamatórias como a IL-6 favorece o desenvolvimento das Th17, enquanto que o TGF- $\beta$  isoladamente promove o fenótipo das Tregs. Apesar disso, ambos os tipos de células são interconvertíveis.(5)

A desregulação das células Th17, produtoras de interleucina 17 (IL-17) poderá estar envolvida na persistência de um ambiente inflamatório, propício ao desenvolvimento de doenças autoimunes, havendo evidências de que esta desregulação poderá ser devida à exposição a determinados fatores ambientais, nomeadamente ao fumo do tabaco ou a hidrocarbonetos aromáticos. (13, 47, 60)

Para além disso, o ambiente a que é exposto o indivíduo pode levar a várias modificações que poderão predispor ao desenvolvimento de autoimunidade, nomeadamente modificações a nível dos autoantígenos ou a nível da metilação do DNA.(46) No que diz respeito aos autoantígenos, a exposição a determinados fatores ambientais pode causar alterações a nível da modificação pós-transcricional, que ocorre normalmente em 50 a 90% das proteínas humanas. Estas alterações podem ocorrer, por exemplo, a nível da metilação ou da fosforilação, provocando alterações na imunogenicidade das proteínas, podendo levar ao desencadeamento de uma resposta imune contra as mesmas.(47) A exposição a determinados fatores ambientais, nomeadamente ao tabaco, álcool e poluentes ambientais é também responsável por alterações a nível da metilação do DNA, pelo que poderá ser importante explorar no futuro as implicações destas alterações no desenvolvimento de autoimunidade. (47)

Atualmente estão descritas na literatura mais de uma centena de doenças autoimunes, as quais podem ser divididas em dois grandes grupos: as doenças específicas de órgão e as doenças autoimunes sistémicas.(3, 43) No primeiro caso, tal como o próprio nome indica, há uma resposta imune a autoantígenos específicos de um determinado órgão, de que são exemplos a Diabetes *Mellitus* tipo I e a Hepatite Autoimune. Por outro lado, nas doenças autoimunes sistémicas, há tipicamente um envolvimento multiorgânico, constituindo doenças com uma evolução progressiva e tipicamente incapacitante. São exemplos de doenças autoimunes sistémicas o Lupus Eritematoso Sistémico e a Artrite Reumatoide.(4)

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), cuja etiologia não está totalmente esclarecida, é caracterizado pela presença de anticorpos antinucleares (ANA), nomeadamente anticorpos de DNA de dupla cadeia (dsDNA). Tem uma apresentação clínica bastante heterogénea, tendo uma evolução progressiva que poderá culminar num desfecho fatal se não for convenientemente tratada. Regra geral verifica-se a inflamação de diversos órgãos e tecidos, apresentando sintomas bastante variáveis em intensidade e gravidade. As erupções cutâneas são bastante frequentes, sendo a erupção avermelhada em forma de asas de borboleta que aparece na face bastante característica. (4, 61)

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença potencialmente incapacitante, em que há inflamação das articulações, levando progressivamente à sua deformação e destruição. Afeta sobretudo as articulações das mãos e pés, no entanto, pode apresentar manifestações extra-articulares, com um envolvimento multiorgânico com a progressão da doença. (4) Tendo em conta que se trata de uma das doenças autoimunes mais frequentes, responsável por elevados níveis de morbilidade, com sérias repercussões a nível socioeconómico e ainda tendo em conta o facto de constituir uma das patologias autoimunes sobre a qual existem mais estudos publicados podendo gerar mais controvérsia ou até mesmo contradições, considera-se útil uma revisão da literatura mais direcionada para esta patologia.

# O EXEMPLO DA ARTRITE REUMATOIDE

---

## Definição

A Artrite Reumatoide é uma doença inflamatória crónica de natureza autoimune que afeta sobretudo as articulações, manifestando-se essencialmente por uma poliartrite e cujas alterações se traduzem pela inflamação da sinovial que conduz progressivamente à sua destruição, levando à perda de função. Constitui assim uma patologia altamente incapacitante. Ainda que as alterações articulares constituam a manifestação predominante, a Artrite Reumatoide é uma doença sistémica, podendo ter manifestações extra-articulares, que surgem habitualmente em fases mais avançadas da doença(4). Algumas dessas manifestações incluem: o Síndrome de Sjögren secundário que ocorre devido à inflamação das glândulas exócrinas que causa secura das mucosas; nódulos reumatoides; serosite devido à inflamação das serosas, podendo inclusivamente levar a derrame pericárdico e pleural; fibrose pulmonar; amiloidose secundária; vasculite reumatoide; artrite séptica e o Síndrome de Felty, caracterizado pela associação de artrite reumatoide, esplenomegalia e leucopenia.(62)

Os doentes com Artrite Reumatoide têm normalmente uma esperança média de vida inferior à da população em geral, em cerca de 3 a 10 anos, sendo que as principais causas de morte neste grupo de doentes são as complicações cardiovasculares, pulmonares, gastrointestinais, hematológicas e infecciosas, decorrentes não só da evolução da doença mas também consequência do tratamento medicamentoso prolongado. (43)

Estima-se que a artrite reumatoide atinja cerca de 0,3 a 1,2% da população mundial.(63) É mais frequente no sexo feminino, havendo um pico de incidência entre os 35 e os 50 anos de idade. (43)

## Etiologia

A etiologia da Artrite Reumatoide é, até ao momento, desconhecida, no entanto, várias hipóteses têm sido levantadas, existindo estudos que sugerem que poderá resultar da interação entre fatores genéticos e fatores ambientais, à semelhança do que acontece com as doenças autoimunes em geral. (43) A maioria dos fatores etiológicos da Artrite Reumatoide é, de facto, comum aos que já foram mencionados para as doenças autoimunes em geral.

Relativamente aos fatores genéticos, o HLA-DRB1 surge frequentemente associado à AR. Além disso, o facto de ser mais prevalente no sexo feminino leva a colocar a hipótese de que na origem desta doença também poderão estar implicados fatores hormonais. De facto, tem-se verificado, em alguns estudos, um nível reduzido de testosterona em indivíduos do sexo masculino com Artrite Reumatoide. São, contudo, necessários estudos adicionais. (43, 64)

No que diz respeito aos fatores ambientais, os seus efeitos são normalmente bastante protelados no tempo, fazendo-se sentir ao fim de vários anos de exposição. O tabaco é um dos fatores de risco ambientais mais importantes, estando associado à produção de Fator Reumatoide (FR) e Anticorpo Anti-Péptido Citrulinado (Anti-CCP).(64) Além disso, o tabaco tem sido associado a um aumento da suscetibilidade à doença em indivíduos portadores do gene HLA-DRB1, independentemente do FR e anti-CCP. (65) Alguns estudos têm estabelecido também uma relação entre a exposição à sílica e o aparecimento de doença, considerando que esta exposição poderá levar à alteração das proteínas endógenas, levando ao aparecimento de autorreatividade. (66)

Determinadas infeções também poderão levar ao desenvolvimento de Artrite Reumatoide em indivíduos geneticamente suscetíveis. Outros fatores, como a dieta, poderão também contribuir para o desenvolvimento desta doença.(67)

<b>Fatores que aumentam suscetibilidade ao desenvolvimento de AR</b>	
<b>Fatores Genéticos</b>	HLA-DRB1 (Klareskog et al, (64)) Mutações PTPN22 (Stanford et al, (48))
<b>Fatores Hormonais</b>	> prevalência no sexo feminino (Tobon et al, (43))
<b>Fatores Ambientais</b>	Tabaco : <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ FR e anti-CCP (Klareskog et al, (64))</li> <li>• &gt; suscetibilidade em portadores de HLA-DRB1 (Bang et al, (65))</li> </ul> Dieta (Pattison et al, (67)) Exposição à sílica (Cooper et al, (66))

**Tabela 2:** Principais fatores envolvidos no aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de Artrite Reumatoide. Abreviaturas: AR: Artrite Reumatoide; FR: fator reumatoide; anti-CCP: anti- péptido citrulinado cíclico.

## Diagnóstico

Em 2010, foram aprovados pelo *American College of Rheumatology* em conjunto com a *European League Against Rheumatism Collaborative Initiative* (EULAR), os novos critérios de classificação de AR, cujo objetivo é a detecção mais precoce da doença, permitindo uma abordagem terapêutica em estádios mais iniciais e, assim, um melhor prognóstico.(68) Até esta altura o diagnóstico de Artrite Reumatoide era baseado essencialmente nos critérios de 1987 (tabela 1).

De acordo com os novos critérios,(68) os pacientes são classificados como tendo AR se tiverem uma classificação igual ou superior a 6 pontos:

- A. Envolvimento articular**
  - 1 grande articulação (0 pontos)
  - 2 a 10 grandes articulações (1 ponto)
  - 1 a 3 pequenas articulações (2 pontos)
  - 4 a 10 pequenas articulações (3 pontos)
  - Mais de 10 articulações, incluindo uma pequena articulação (5 pontos)
  
- B. Serologia**
  - Fator Reumatoide (FR) e Anti-Péptido Citrulinado Cíclico (Anti-CCP) negativos (0 pontos)
  - FR ou Anti-CCP fracamente reativos (2 pontos)
  - FR ou Anti-CCP altamente reativos (3 pontos)
  
- C. Reagentes de fase aguda**
  - Velocidade de Sedimentação (VS) e Proteína C Reativa PCR) normais (0 pontos)
  - VS e PCR alterados (1 ponto)
  
- D. Duração dos Sintomas**
  - Menos de 6 semanas (0 pontos)
  - 6 ou mais semanas (1 ponto)

A Artrite Reumatoide é uma doença crónica, pelo que o principal objetivo terapêutico é a diminuição da atividade da doença, minimizando a destruição articular e

procurando a manutenção de uma boa atividade funcional. Pretende-se, assim, prevenir ou pelo menos atrasar a progressão da doença para um estado de incapacidade.

Atualmente o tratamento farmacológico da Artrite Reumatoide baseia-se na utilização de anti-inflamatórios não esteroides (AINES), analgésicos, corticosteroides e agentes antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs). Este último grupo inclui os DMARDs clássicos, como o metotrexato e a sulfassalazina, e os DMARDs biológicos. Os agentes anti-TNF foram os primeiros DMARDs biológicos aprovados para o tratamento da Artrite Reumatoide, dos quais fazem parte o etanercept, abatacept, adalimumab, anakinra, golimumab, infliximab, rituximab e tocilizumab. Os DMARDs constituem atualmente, das classes de medicamentos usadas no tratamento da artrite reumatoide, a única com capacidade para alterar o curso da doença, controlando a sua progressão.<sup>(63)</sup> A sua utilização, porém, deve ser restrita a determinados doentes, sendo as suas principais indicações doentes que mantêm doença ativa apesar de terapêutica adequada com as restantes classes medicamentosas habitualmente usadas, nomeadamente os DMARDs clássicos e doente com DAS 28<sup>9</sup> > 3,2 ou entre 2,6 e 3,2 em caso de evidência de agravamento da doença. <sup>(69)</sup>

Vários estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos no sentido de compreender os potenciais efeitos terapêuticos das células T reguladoras no tratamento da Artrite Reumatoide.

<p align="center"><b><u>Classificação de 1987:</u></b> Pelo menos 4 dos seguintes critérios</p>	<p align="center"><b><u>Classificação de 2010:</u></b> Necessária uma pontuação igual ou superior a 6 para a classificação definitiva de um paciente com AR</p>
<p align="center">Rigidez matinal</p>	<p align="center"><b><u>Envolvimento articular (0-5)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1 grande articulação – 0</li> <li>▪ 2-10 grandes articulações – 1</li> <li>▪ 1-3 pequenas articulações – 2</li> <li>▪ 4-10 pequenas articulações – 3</li> <li>▪ + 10 articulações, incluindo uma pequena articulação – 5</li> </ul>
<p align="center">3 ou mais superfícies articulares afetadas</p>	<p align="center"><b><u>Serologia (0-3)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FR e Anti-CCP negativos – 0</li> <li>▪ FR e Anti-CCP pouco reativos – 2</li> <li>▪ FR e Anti-CCP altamente reativos – 3</li> </ul>

<sup>9</sup> *Disease Activity Score*: sistema desenvolvido e aprovado pela EULAR para medir a atividade da Artrite Reumatoide, sendo usadas para o seu cálculo 28 articulações. O DAS28 varia entre 2 e 10, sendo que quanto maior o valor, maior é a atividade da doença.

Atingimento das articulações das mãos	<p align="center"><b><u>Reagentes de fase aguda (0-1)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ VS e PCR normais – 0</li> <li>▪ VS e/ou PCR alterados – 1</li> </ul>
Artrite simétrica	<p align="center"><b><u>Duração dos sintomas (0-1)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ &lt;6 Semanas – 0</li> <li>▪ &gt;6 Semanas – 1</li> </ul>
Nódulos reumatoides	
FR Positivo	
Alterações radiológicas	

**Tabela 3:** Comparação dos Critérios de Classificação da Artrite Reumatoide de 1987 e 2010 do Colégio Americano de Reumatologia. Abreviaturas: AR: Artrite Reumatoide; FR: Fator Reumatoide; VS: velocidade de sedimentação; PCR: *Polymerase chain reaction*.

## Papel das Células T Reguladoras na Fisiopatologia da Artrite Reumatoide

A Artrite Reumatoide é caracterizada por uma inflamação crónica da sinovial, na qual participam linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e ainda citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ . Vários estudos sugerem que uma falha na regulação dos linfócitos T poderá estar na base da fisiopatologia desta complexa doença. Poderá assim ser devida a uma resposta inflamatória exagerada aliada a uma deficiência nos mecanismos responsáveis pelo controlo da autoimunidade. (70)

Desde que em 1995, Sakaguchi *et al* demonstrou a existência de uma pequena população de células T com capacidade supressora, diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de compreender de que forma estas células poderão estar envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos das doenças autoimunes.

Nos últimos anos, vários estudos têm sugerido que as células T reguladoras estão implicadas na patogenia da Artrite Reumatoide, no entanto, o seu papel nesta doença não está totalmente esclarecido.(26) Existem, de facto, algumas controvérsias relativamente à frequência destas células na circulação periférica de doentes com Artrite Reumatoide, havendo estudos que mostram um aumento destas células, outros uma diminuição e outros que mostram um número semelhante ao que é encontrado nos controlos saudáveis(26). Num dos estudos, *Van Amelsfort et al* mostrou existir um aumento das células CD4+CD25+ no sangue periférico e no líquido sinovial de indivíduos com Artrite Reumatoide. (70) Já *Liu M.F. et al* demonstrou que existe um aumento significativo das células T reguladoras (CD4+CD25+) no líquido sinovial mas não no sangue periférico, o que parece ser consistente com outros estudos realizados.(57)

	Nº Tregs (SP)	Nº Tregs (LS)	Nº doentes	Método de detecção usado	Marcador Tregs	Fase da doença			
						Nº anos doença (média)	FR (+/-)	Corticoides (+/-)	Anti-TNF $\alpha$ (+/-)
<i>Van Amelsfort et al, 2004</i>	↗	↗	105 (F:75 M: 30)	Citometria de fluxo	CD25	15	7/28	20/85	8/97
<i>Liu M.F. et al.,2005</i>	SA	↗	60 (F:52 M:8)	Citometria de fluxo	CD25	-	-	-	-
<i>Möttönen et al,2005</i>	SA	↗	18 (F:14; M:4)	Citometria de fluxo	CD25/ Foxp3	14	5/9	10/4	-

**Tabela 4:** Variação do número de Tregs nos indivíduos com Artrite Reumatoide comparativamente aos controlos saudáveis. Abreviaturas: SP: sangue periférico; LS: líquido sinovial; SA: sem alterações; FR: Fator Reumatoide

*Möttönen et al* demonstrou também um aumento do número de células T reguladoras no líquido sinovial de pacientes com Artrite Reumatoide, sendo esse número superior ao existente no sangue periférico. No entanto, quando comparado com os controlos saudáveis, a diferença no número de células CD4+CD25+ no sangue periférico de pacientes com Artrite Reumatoide não foi significativa. Sugere assim a existência de uma acumulação destas células nas articulações destes pacientes, ainda que não haja alterações significativas nos níveis circulantes(71). Além disso, alguns estudos sugerem que as Tregs podem ser induzidas pela ativação das células T efectoras, o que poderá explicar este aumento na concentração das células T reguladoras no líquido sinovial, uma vez que são, nesta patologia, locais de grande atividade inflamatória. (5)

Contudo, apesar de existir um elevado número de células T CD4+CD25+ na membrana sinovial nestes pacientes, a inflamação persiste, pelo que leva a colocar as hipóteses de existência de um defeito funcional destas células ou por outro lado uma eventual resistência das células T efectoras à ação das Tregs.(5)

Num dos estudos desenvolvidos por *Ehrenstein et al*, o autor verificou que as células T reguladoras isoladas de doentes com Artrite Reumatoide eram capazes de suprimir a proliferação das células T efectoras em níveis semelhantes àquelas isoladas em indivíduos saudáveis ou em doentes após terem recebido terapia com anti-TNF $\alpha$ . Contudo, eram incapazes de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos monócitos e células T ativadas, nomeadamente o TNF- $\alpha$ . (72)Este defeito na função das Tregs poderá ser devido inclusivamente à elevada expressão desta



citocina, que poderá ser responsável pela diminuição da expressão de Foxp3 pelas mesmas. (73) Desta forma, é sugestivo de que o defeito na supressão poderá ser devido a uma falha na função das Tregs e não a uma resistência das células T efectoras à ação das mesmas (72).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória com um papel fundamental na fisiopatologia da Artrite Reumatoide, à semelhança do que ocorre em outras doenças autoimunes. De facto, tem grande importância no início e persistência da doença. (72, 74) Em condições normais esta citocina é produzida pelos monócitos, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B em resposta a uma agressão, podendo existir sob a forma transmembranar (mTNF- $\alpha$ ) ou sob a forma solúvel (sTNF- $\alpha$ ) e atuando através da ligação a dois recetores distintos (TNFR1 e TNFR2). (74)

A terapia anti-TNF $\alpha$ , de que são exemplos o infliximab, o adalimumab ou o etanercept, tem tido um papel fundamental no controlo da doença, no entanto, o seu efeito sobre a população de células T reguladoras é ainda pouco conhecido. (73)

Alguns estudos têm revelado que o uso de terapia anti-TNF $\alpha$ , nomeadamente o infliximab, leva ao aparecimento de uma nova população de células T reguladoras que não expressam o ligando da L-selectina CD62L (CD62L<sup>-</sup>), as *induced* Treg (iTreg), capazes de suprimir as citocinas proinflamatórias via TGF- $\beta$  e IL-10. As nTreg (CD62L<sup>+</sup>), por outro lado, mantêm a deficiência na sua função mesmo após tratamento com anti-TNF $\alpha$ . (5) Sugere assim que a restituição da função das Tregs após terapia com anti-TNF $\alpha$  se deve à nova população de células T reguladoras e não à recuperação da função pelas nTreg, como inicialmente se pensou. (74) Adicionalmente alguns estudos sugerem um aumento da expressão de Foxp3 induzido pelo tratamento com anti-TNF $\alpha$ . (73) Estes resultados foram obtidos utilizando o infliximab, um dos anti-TNF $\alpha$  mais usados no tratamento da Artrite Reumatoide. No entanto, num estudo, que teve por objetivo avaliar o efeito do etanercept e adalimumab nas Tregs de indivíduos com Artrite Reumatoide, verificou-se que nenhum deles provocou alterações significativas a nível quantitativo ou qualitativo nas mesmas, independentemente de serem ou não respondedores à terapêutica. (73) Esta diferença encontrada entre os diferentes agentes anti-TNF- $\alpha$  poderá estar relacionada com o facto de estes apresentarem mecanismos de ação distintos. De facto, o Adalimumab e o Infliximab atuam bloqueando os recetores solúveis e os recetores transmembranares do TNF- $\alpha$ , enquanto que o Etanercept atua apenas sobre os recetores solúveis. Poderá ainda ser influenciada pela via de administração, uma vez que o Infliximab é administrado por via endovenosa, sendo o Adalimumab e o Etanercept administrados por via subcutânea. (73, 75)

Além dos estudos com o TNF- $\alpha$ , foi demonstrado que também a IL-6, outra citocina pró-inflamatória, poderá afetar a função das Tregs, sendo que o bloqueio do seu recetor pelo Tocilizumab é responsável pela diminuição da severidade da doença, no caso da rejeição de transplantes, bem como pelo aumento do número de Tregs. Este aumento poderá ser devido à conversão de células T efectoras em células T reguladoras. Estes resultados não foram, contudo, observados nas Tregs existentes no líquido sinovial de

pacientes com Artrite Reumatoide, pelo que é necessária maior investigação nesta área.(76)

Uma das hipóteses apontadas para o defeito na função das Tregs é a diminuição da expressão de CTLA-4 em indivíduos com Artrite Reumatoide, que como já referido anteriormente, é essencial para a correta função destas células(74). De facto, alguns estudos mostram uma diminuição da expressão de CTLA-4 pelas Tregs nesta patologia, sendo que a sua reposição *in vitro* poderá ser capaz de restituir a sua função(26). Existe atualmente disponível no mercado uma proteína de fusão composta pela região Fc da imunoglobulina IgG1 e pelo domínio extracelular do CTLA-4, de que é exemplo o Abatacept, usada no tratamento da Artrite Reumatoide e que pode ter um efeito importante sobre a função supressora das Tregs. (77)

Outros estudos têm demonstrado o envolvimento de micro-RNAs (miRNAs) na função e proliferação das Treg. Os miRNAs são um pequeno tipo de RNA não codificante que regula a expressão genética. Apesar de estudos anteriores terem demonstrado que alterações na sua expressão poderão levar à ocorrência de profundas alterações a nível da função das Tregs e ao conseqüente desenvolvimento de doenças autoimunes, Smigielska-Czepiel et al, num estudo que pretendia analisar a expressão de miRNA em células T reguladoras, células T *naive* e células T de memória, não encontrou alterações específicas relacionadas com a Artrite Reumatoide. Contudo, verificou existir uma correlação positiva entre a expressão de miR-451, um tipo de miRNA, e o DAS28 da Artrite Reumatoide, tendo-se verificado um aumento da expressão de miRNA nos pacientes com DAS28 mais elevados. Além disso, foi ainda sugerida uma relação entre este tipo de miRNA e os níveis de IL-6 em indivíduos com doença ativa, sendo, no entanto, necessários mais estudos para determinar mais concretamente esta possível relação. (78)

Por outro lado, a existência de uma resistência por parte das células T efectoras à ação das Tregs é menos consistente na literatura, ainda que haja relatos da existência de indução da apoptose das células T reguladoras pelas células T ativadas. (5) No entanto, implicaria uma diminuição dessas células em indivíduos com Artrite Reumatoide comparativamente aos indivíduos saudáveis, o que não é consistente com a maioria dos estudos publicados.

Alguns estudos sugerem ainda que as células T reguladoras poderão atuar diretamente sobre o tecido ósseo, nomeadamente na inibição da atividade dos osteoclastos. De facto, verificou-se que o número de Tregs no sangue periférico variava de forma inversa ao número de marcadores de osteoclastogénese, quer nos indivíduos doentes, quer nos controlos saudáveis, sugerindo assim um possível papel das Tregs na proteção contra a destruição óssea. (79)

Componentes envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da Artrite Reumatoide	Referência	Modelo usado	Alterações encontradas
Tregs	<i>Van Amelsfort et al, 2004 (70), Liu M.F. et al, 2005, (57), Möttönen et al, 2005 (71)</i>	LS de doentes com AR	- ↑Tregs no LS em doentes com AR;
	<i>Ehrenstein et al, 2004 (72)</i>	-	- Incapacidade para suprimir a produção de citocinas inflamatórias.
TNF- $\alpha$	<i>Blache et al, 2011 (73)</i>	Pacientes com AR	- Anti-TNF- $\alpha$ → ↑expressão de Foxp3 ;
	<i>Cooles et al, 2013 (5, 63)</i>	-	- Infliximab → nova população de Tregs (capacidade para suprimir citocinas inflamatórias).
CTLA-4	<i>Chavele et al, 2011 (26)</i>	-	- ↓ Expressão de CTLA-4 pelas Tregs na AR.
miRNAs	<i>Smigielska-Czepiel et al, 2014 (78)</i>	SP de doentes com AR	- ↑ Expressão de miR-45 em doentes com DAS28 mais elevados.

**Tabela 5:** Principais componentes envolvidos na fisiopatologia da Artrite Reumatoide. Abreviaturas: miR-45: subtipo de microRNA, RNA não codificante que regula a expressão genética; AR: Artrite Reumatoide; LS: líquido sinovial; SP: sangue periférico.

# MANIPULAÇÃO DAS TREG COMO ALVO TERAPÊUTICO

---

Atualmente o tratamento da Artrite Reumatoide baseia-se, como já foi referido na utilização de anti-inflamatórios não esteroides, corticosteroides e fármacos modificadores da doença, no entanto, esta terapêutica necessita de ser mantida ao longo da vida e além disso causa um elevado grau de imunossupressão, que poderá constituir uma porta de entrada a infeções ou mesmo ao desenvolvimento de neoplasias.

Desta forma, um dos grandes objetivos nesta área seria encontrar um tratamento eficaz, que permitisse a restituição da tolerância imunológica e que fosse de utilização temporária.

Apesar do papel das Tregs na fisiopatologia da Artrite Reumatoide não estar ainda bem claro, estas células têm despoletado cada vez mais interesse, sendo consideradas por vários autores apostas promissoras no futuro na abordagem terapêutica da Artrite Reumatoide. Efetivamente estas células seriam o alvo ideal ao permitirem a supressão das células T efectoras de forma específica, o que diminuiria os riscos de uma imunossupressão sistémica. Além disso, estudos em murinos têm demonstrado que um tratamento de curto prazo utilizando células T reguladoras é capaz de causar remissão da doença a longo prazo.

Na verdade, a terapêutica atualmente instituída já envolve de alguma forma as células T reguladoras, nomeadamente no caso dos anti-TNF $\alpha$ , como já foi mencionado anteriormente.

Nos últimos anos, vários estudos têm sido desenvolvidos no sentido de compreender de que forma as células T reguladoras poderão ser usadas no tratamento da Artrite Reumatoide, sendo exploradas e testadas as diversas formas de as manipular.

Atualmente, consideram-se potenciais mecanismos os que atuam diretamente nas Tregs, nomeadamente a sua indução e expansão *in vitro* e indução de Tregs de novo. Têm ainda sido considerados agentes que atuam na melhoria da ação das Tregs de forma indireta.(80)

Ainda que as Tregs sejam caracteristicamente marcadas por uma baixa proliferação *in vitro*, alguns estudos têm demonstrado a possibilidade de isolar as Tregs *in vivo* e posteriormente estimular a sua expansão *in vitro*. Verificou-se ainda que as Tregs resultantes desta expansão são capazes de sobreviver quando novamente transferidas *in vivo*, indicando assim que a sua expansão poderia constituir um método eficaz para obter uma população de Tregs suficientemente grande para ser utilizada com fins

terapêuticos.(80) Contudo, uma das grandes dificuldades neste processo é obter uma população de Tregs totalmente pura, uma vez que não são conhecidos marcadores absolutamente específicos para estas células. De facto, é difícil obter células T reguladoras, livres da “contaminação” por células T efectoras, levando então à expansão de ambos os tipos de células T, (81) o que poderá levar inclusivamente ao agravamento da doença. Assim, têm sido propostas algumas estratégias para tentar ultrapassar este obstáculo, existindo alguns estudos que sugerem a adição de rapamicina às culturas em expansão, um imunossupressor capaz de promover a sobrevivência e proliferação das Tregs e, ao mesmo tempo, de reduzir a proliferação de células T efectoras. (80, 81) A rapamicina poderá prevenir a perda da expressão de CD25 e de Foxp3, (82) porém um estudo recente verificou que a sua ação sobre as Tregs poderá ser comprometida na presença de citocinas pró-inflamatórias. (83)

Outro dos obstáculos que tem surgido à obtenção de uma população de Tregs totalmente pura é o facto de estas células, em algum momento e sob determinadas condições, se poderem converter em células T efectoras, perdendo a expressão de CD25 e/ou de Foxp3, o que mais uma vez poderá levar a um agravamento da patologia, ao invés de melhorar a inflamação. (80, 82)

Além disso, é difícil avaliar se as células resultantes da expansão das Tregs são totalmente puras. Um dos marcadores mais utilizados é o FoxP3, no entanto, como já referido, este marcador não é totalmente específico das células T reguladoras, pelo que numa população de células FoxP3<sup>+</sup> é possível que algumas dessas células não sejam células T reguladoras.(16)

Apesar de constituírem métodos promissores, tanto a expansão de células Tregs *in vitro* como a indução de Tregs de novo, poderão levar à proliferação de uma população policlonal de células T reguladoras e, portanto a uma supressão inespecífica do sistema imune, podendo constituir um risco acrescido, nomeadamente para infeções ou mesmo para o desenvolvimento de neoplasias. Assim, esta dificuldade poderia ser ultrapassada através da indução de células T reguladoras específicas para um determinado antigénio. Neste sentido, têm sido desenvolvidos alguns estudos para testar o efeito da administração de autoantigénios sobre as Tregs em modelos animais, sendo a via oral a que demonstrou inicialmente resultados mais promissores e a mais adequada para ser aplicada em humanos. (80) Contudo, na maioria das vezes o antigénio responsável pelo início da doença é desconhecido, como é o caso da Artrite Reumatoide, o que constitui um obstáculo à obtenção de Tregs antigénio-específicas. Num estudo, *Wright et al* procurou testar a possibilidade de obter células T reguladoras antigénio-específicas a partir da transferência de genes por transdução retroviral. Assim, utilizou duas estratégias distintas: a transferência de genes do recetor de células T (TCR) e, por outro lado, a transferência conjunta de genes TCR e Foxp3<sup>+</sup>. A primeira permitiu a obtenção de Tregs antigénio-específicas a partir de uma população de nTregs, enquanto que a segunda permitiu a obtenção do mesmo tipo de células mas a partir de uma população de células T efectoras. As células T reguladoras antigénio específicas assim obtidas demonstraram eficácia em monoterapia, prevenindo a inflamação e destruição tecidual.(84) Num outro estudo,

obtiveram-se Tregs antigénio-específicas através da transferência do gene TCR do lentivírus *in vitro* para uma população de nTregs, que demonstraram capacidade para suprimir a ação das células T efectoras. (85) Poderão assim constituir um método promissor e com eventual potencial terapêutico na abordagem das doenças autoimunes, sem haver necessidade de conhecer qual o antigénio responsável pelo início da doença.

Alguns estudos em animais sugerem que o tratamento com IL-2 é capaz de melhorar a função e estimular a proliferação das células T reguladoras. Num estudo em ratinhos NOD<sup>10</sup>, verificou-se que a administração de IL-2 era acompanhada do aumento do número de Tregs e de uma diminuição do desenvolvimento de *Diabetes Mellitus*. (86) Desta forma, esta citocina poderá ter um papel relevante na abordagem terapêutica das doenças autoimunes, nomeadamente na Artrite Reumatoide.

As células B reguladoras (Bregs) têm tido um papel cada vez mais relevante na manutenção da tolerância imunológica. *Flores-Borja et al* verificou que a capacidade supressora das Bregs estava diminuída em pacientes com Artrite Reumatoide. Adicionalmente, demonstrou que estas células eram capazes de converter células T efectoras em células T reguladoras, tendo encontrado uma correlação positiva entre a frequência da Bregs e a intensidade da expressão de Foxp3 pelas Tregs. (87) Desta forma, estas células poderão constituir um alvo útil para aumentar o número de células T reguladoras em indivíduos com Artrite Reumatoide.

Alguns estudos têm demonstrado a possibilidade de utilizar agentes imunomoduladores que estimulem a proliferação de células T reguladoras, nomeadamente neuropéptidos, (88) ácido retinóico (89) e anticorpos anti-CD3. (90)

Relativamente aos neuropéptidos, alguns estudos demonstram que o péptido intestinal vasoativo (VIP) é capaz de reduzir a progressão de algumas doenças autoimunes, promovendo a indução, expansão e melhoria da função das Tregs. Num estudo realizado, este péptido provocou uma diminuição da severidade da artrite induzida por colagénio em ratinhos. (88) Além disso, a ausência de VIP está associada a uma diminuição da expressão de Foxp3 e do número de Tregs, sugerindo assim que este péptido poderá ter um papel determinante na tolerância imunológica, ao interferir na regulação da proliferação das células T reguladoras. (91) Adicionalmente o VIP é um agente anti-inflamatório, pelo que o seu efeito sobre as Tregs poderá ser influenciado pelo facto de este neuropéptido provocar inibição das citocinas pró-inflamatórias. (5, 80)

*Wang et al*, num estudo em que uma população de células T CD4<sup>+</sup> cultivada com e sem a adição de ácido all-trans retinóico<sup>11</sup> (ATR), demonstrou que o ATR é capaz de induzir a geração de Tregs de novo a partir de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> na presença de TGF-β, prevenindo ainda a perda de expressão de Foxp3 pelas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. (89) Estudos revelam ainda que esta capacidade é mantida mesmo na presença de citocinas

---

<sup>10</sup> *Non-obese diabetic*, modelo experimental de Diabetes autoimune.

<sup>11</sup> Metabolito da Vitamina A

pró-inflamatórias. (83) Desta forma, o ATR pode ser um componente importante para a proliferação das células T reguladoras.

Por outro lado, o uso de anti-CD3, um anticorpo monoclonal, usado inicialmente na prevenção da rejeição aguda de transplantes, tem revelado um potencial efeito na indução das Tregs. *Notley et al*, com o objetivo de estudar o potencial terapêutico dos anticorpos anti-CD3 na Artrite Reumatoide, usou um modelo de artrite induzida por colagénio em ratinhos, ao qual foi administrado anti-CD3, tendo sido monitorizada a severidade da doença durante um período de dez dias. Assim, verificou uma diminuição da atividade da doença e um aumento da população de células T reguladoras. (90)

Para além dos métodos enumerados, existem ainda outros métodos que poderão atuar sobre as células T reguladoras, de forma indireta, melhorando a sua função. De facto, tendo em conta que a função das Tregs é afetada de forma negativa pelas citocinas pró-inflamatórias, a inibição destas citocinas poderá resultar no restabelecimento da sua função.

Com efeito, o papel da inibição das citocinas pró-inflamatórias, tem sido demonstrado em alguns estudos, verificando-se uma melhoria na função das Tregs após tratamento com anti-TNF $\alpha$ , terapêutica atualmente já instituída na abordagem da Artrite Reumatoide. (92) De facto, como já foi mencionado anteriormente, a propósito do papel das Tregs na fisiopatologia da Artrite Reumatoide, tem sido sugerido que o tratamento com Infliximab, um anti-TNF $\alpha$ , leva ao aparecimento de uma nova população de células T reguladoras e ainda a um aumento da expressão de Foxp3. (74)

A IL-6 é outra das citocinas proinflamatórias que tem suscitado algum interesse. Na presença de IL-6 e TGF- $\beta$  as células T *naive* diferenciam-se em células Th17, enquanto que na sua ausência adquirem um fenótipo de Tregs. (6) Num estudo que pretendia avaliar o efeito do bloqueio desta citocina na fisiopatologia da doença do enxerto contra o hospedeiro verificou-se que o bloqueio da IL-6 estava associado a um aumento das células T reguladoras e, conseqüentemente a uma diminuição da severidade da doença.(93) Desta forma, esta citocina poderá constituir um alvo adicional para o tratamento das doenças autoimunes, já existindo inclusivamente no mercado, como já referido anteriormente, um fármaco que atua através do bloqueio do recetor de IL-6, o Tocilizumab.

Para além das Tregs “convencionais” existe ainda uma população de Tregs que não expressa Foxp3, as células Tr1, que caracteristicamente secreta elevados níveis de IL-10. Um estudo recente demonstrou, através do isolamento de células dendríticas em indivíduos com Artrite Reumatoide em remissão terapêutica, que estas células são capazes de induzir a formação desta nova população de células T reguladoras com capacidade para suprimir a proliferação de células T efectoras. Verificou-se ainda que o restabelecimento das células dendríticas em circulação estaria associado a uma melhoria no curso da doença, sustentando a hipótese de que as células T reguladoras induzidas pelas células dendríticas poderão estar envolvidas no restabelecimento da tolerância imunológica. Desta forma, estas células poderão eventualmente ser usadas como base

para o desenvolvimento de novas abordagens no tratamento da Artrite Reumatoide, sendo para isso necessários mais estudos que corroborem a sua utilidade e potencialidade e que avaliem a sua aplicabilidade como alvo terapêutico(92).

Estratégia terapêutica	Referência	Método utilizado	Efeitos sobre as Tregs
Bregs	<i>Flores-Borja et al , 2013(87)</i>	SP de doentes com AR	↑ N° de Tregs
Tregs antigénio-específicas obtidas por transdução mediada por retrovírus	<i>Wright et al,2009 (84)</i>	Artrite induzida por antigénios	↑ da capacidade supressora das nTregs; Obtenção de Tregs antigénio específicas a partir de células T CD4 <sup>+</sup>
IL-2	<i>Tang et al, 2008 (86)</i>	Ratinhos NOD	↑ N° de Tregs
VIP	<i>Deng et al, 2010 (88)</i>	Artrite induzida por colagénio	↑ N° de Tregs
ATR	<i>Wang et al, 2009 (89)</i>	Culturas de SP de humanos	↑ N° de Tregs
Anti-CD3	<i>Notley et al, 2010 (90)</i>	Artrite induzida por colagénio	↑ N° de Tregs
Infliximab (anti-TNF $\alpha$ )	<i>Biton et al, 2012 (74)</i>	-	↑ Capacidade supressora das Tregs
IL-6	<i>Thiolat et al, 2014 (76)</i>	Artrite induzida por colagénio	↑ N° de Tregs
Células Dendríticas	<i>Kavousanaki et al, 2010 (92)</i>	SP e LS de doentes com AR	Indução de Tregs Foxp3 <sup>-</sup>

**Tabela 6:** Estratégias terapêuticas que influenciam o número ou a função das células T reguladoras. Abreviaturas: SP: Sangue periférico; LS: líquido sinovial; AR: Artrite Reumatoide; ATR: Ácido all-trans Retinóico; VIP: Péptido Intestinal Vasoativo; IL-2: Interleucina-2; Bregs: células B reguladoras.



# DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

---

As células T reguladoras (Tregs) são uma subpopulação de células T com um papel fundamental na tolerância imunológica, extremamente importante na prevenção do desenvolvimento de autoimunidade.

Descritas pela primeira vez por *Sakaguchi et al* como células possuidoras de capacidade supressora, têm desde então despoletado um interesse cada vez maior, motivando o desenvolvimento de diversos estudos que procuram um conhecimento mais aprofundado das suas características e uma melhor compreensão do papel destas células na fisiopatologia das doenças autoimunes.

As Tregs são caracteristicamente células anérgicas e com uma reduzida capacidade de proliferação, corresponde a uma subpopulação minoritária das células T existentes em humanos. Tendo em conta o local de onde são originárias, podemos classificar as células T reguladoras em *natural* Tregs (nTregs) que têm origem no timo, e as *induced* Tregs (iTregs) que se originam na periferia a partir de outras células T. Apesar dos dois tipos de células apresentarem capacidade supressora praticamente sobreponível, tem sido demonstrada alguma instabilidade das nTregs quando expostas a um ambiente inflamatório, podendo inclusivamente adquirir um fenótipo Th17.

As Tregs não possuem nenhum marcador completamente específico, no entanto, apesar disso, o fator de transcrição Foxp3 (*Forkhead box protein 3*) tem sido identificado como um regulador major da sua formação, essencial ao desenvolvimento da sua capacidade supressora. Este marcador surge, de facto, fortemente associado a esta subpopulação de células T, estando inclusivamente documentada a associação entre a ocorrência de erros na expressão deste fator de transcrição e o desenvolvimento de patologia autoimune. O facto de não existir nenhum marcador absolutamente específico faz com que diferentes estudos utilizem marcadores de fenotipagem distintos, o que se traduz numa maior dificuldade quando se pretendem comparar os resultados. Desta forma, um dos objetivos em estudos futuros deverá ser o estabelecimento de marcadores adicionais que permitam assim a obtenção de um maior conhecimento da função e da estabilidade das Tregs.

Apesar de os mecanismos de ação das Tregs não estarem ainda totalmente esclarecidos, têm sido considerados três mecanismos fundamentais que incluem a supressão através de citocinas inibitórias, a disrupção metabólica e a supressão através do contacto célula a célula que inclui a citólise por ação das granzimas A e B e a modulação da maturação e da função das células dendríticas.

Vários estudos têm demonstrado que as Tregs desempenham uma função protetora contra o desenvolvimento de doenças autoimunes, particularmente no caso da Artrite

Reumatoide, tendo sido documentadas alterações tanto a nível quantitativo como qualitativo das células T reguladoras nestas patologias.

No caso da Artrite Reumatoide, consideramos as Tregs separadas em dois compartimentos distintos: aquelas que existem no sangue periférico e aquelas que estão presentes nos locais de inflamação. No que diz respeito à frequência das Tregs no sangue periférico existem resultados discordantes entre os estudos existentes na literatura. De facto, alguns reportam a existência de diminuição, outros um aumento e outros que não detetam alterações relativamente ao número existente nos indivíduos saudáveis. Por outro lado, relativamente às células existentes no líquido sinovial os estudos são mais concordantes, reportando um aumento do seu número. Apesar disso, parece existir neste local um comprometimento da função das células T reguladoras, o que poderá explicar a persistência da inflamação perante o aumento do número de Tregs no líquido sinovial. De facto, as Tregs presentes nos locais de inflamação (articulações) apesar de apresentarem capacidade para suprimir a proliferação das células T efectoras revelam-se, contudo, incapazes de suprimir a produção de citocinas proinflamatórias, como o TNF- $\alpha$  ou a IL-6, as quais desempenham um papel determinante na fisiopatologia da Artrite Reumatoide, à semelhança do que ocorre com outras doenças autoimunes.

Atualmente o tratamento da Artrite Reumatoide inclui a utilização de agentes anti-TNF $\alpha$ , de que é exemplo o Infliximab. Apesar do seu efeito sobre as Tregs ser ainda pouco conhecido, existem fortes evidências de que o uso desta terapêutica possa levar ao aparecimento de uma nova população de células T reguladoras com a particularidade de possuírem a capacidade para suprimir as citocinas proinflamatórias, sendo ainda reportado um aumento da expressão de Foxp3 por estas células.

Para além das citocinas proinflamatórias existem ainda outros componentes das Tregs que são apontados como possíveis responsáveis pela deficiente função destas células, nomeadamente a diminuição da expressão de CTLA-4, o qual é fundamental para a sua correta função. Existem ainda estudos que sugerem que poderá existir aumento da resistência das células T efectoras à ação das Tregs, ao invés de um defeito da função destas.

Ainda relativamente ao tratamento atual da Artrite Reumatoide, este inclui agentes imunossuppressores e agentes biológicos capazes de controlar eficazmente a atividade da doença, porém, geralmente não originam uma remissão completa da mesma a longo prazo, sendo necessária a sua administração ao longo da vida. Esta utilização a longo prazo está associada a uma diversidade de efeitos secundários resultantes da imunossupressão causada, nomeadamente o aumento da suscetibilidade a infeções.

Desta forma, as Tregs têm despoletado cada vez mais interesse, sendo consideradas por vários autores apostas promissoras na abordagem terapêutica da Artrite Reumatoide futuramente. De facto, a utilização destas células como alvo terapêutico poderia resolver o problema da imunossupressão sistémica que surge associada às terapêuticas atuais.

Atualmente, as terapias que permitem a expansão ou a indução de Tregs de novo estão sob investigação, havendo estudos que apresentam resultados bastante promissores. Porém, uma das grandes dificuldades encontradas na manipulação das Tregs deve-se ao facto de não existirem ainda marcadores totalmente específicos para estas células. Esta situação dificulta, por exemplo, a obtenção de uma população de Tregs livre da contaminação por células T efectoras, podendo levar à expansão de ambos os tipos de células e, conseqüentemente, a um eventual agravamento da doença.

Deste modo, apesar das células T reguladoras surgirem como componentes promissores para o restabelecimento da tolerância imunológica, há ainda muito para esclarecer no que diz respeito às suas características e ao seu papel na fisiopatologia das doenças autoimunes. Com efeito, grande parte dos estudos encontra-se em fase pré-clínica, pelo que não é conhecida ainda a sua eficácia e o seu comportamento em humanos.

# AGRADECIMENTOS

---

Quero deixar um agradecimento à Dr<sup>a</sup> Sofia Vale Pereira, minha orientadora, pela disponibilidade, pelos conselhos, pelos esclarecimentos e pela compreensão.

Agradeço à Professora Doutora Anabela Mota Pinto, Professora Catedrática de Fisiopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, minha coorientadora, por todo o apoio, por todos os recursos que nos colocou à disposição e pela disponibilidade.

Gostaria também de agradecer à Dr<sup>a</sup> Helena Donato, diretora do Serviço de Documentação do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, que gentilmente se disponibilizou para nos dar uma formação na área de “Pesquisa bibliográfica” e “Publicação Científica”.

Agradeço também a todos os que, ao longo destes seis anos de curso, contribuíram para a minha formação, por todos os conhecimentos e experiências partilhadas, e a todos aqueles que me transmitiram a paixão pela Medicina e me fizeram ter a certeza de ter escolhido o caminho certo.

Por fim, agradeço aos meus pais, grandes impulsionadores de todo o meu percurso. Ao meu pai que recentemente partiu sem me ver concluir esta etapa, mas que continua presente em todos os momentos da minha vida. À minha mãe que sempre me apoiou e incentivou a lutar pelos meus objetivos e a nunca desistir perante as maiores adversidades.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Donato H, Marinho RT. Como fazer Pesquisa Bibliográfica com Eficácia? As Estratégias do *Push* e do *Pull*. Acta Médica Portuguesa; 2013. p. 471-5.
2. Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. Clin Sci (Lond). 2009;116(8):639-49.
3. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. J Autoimmun. 34. England: 2009 Elsevier Ltd; 2010. p. J168-77.
4. Pereira da Silva JA. Reumatologia prática. 2ª ed. Coimbra: Diagnóstico; 2005. p. 19.4-22.
5. Cooles FA, Isaacs JD, Anderson AE. Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. Curr Rheumatol Rep. 2013;15(9):352.
6. Wright GP, Stauss HJ, Ehrenstein MR. Therapeutic potential of Tregs to treat rheumatoid arthritis. Semin Immunol. 2011;23(3):195-201.
7. Wu Y, Zheng Z, Jiang Y, Chess L, Jiang H. The specificity of T cell regulation that enables self-nonsel self discrimination in the periphery. Proc Natl Acad Sci U S A. 1062009. p. 534-9.
8. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Kuby Imunologia. 4th ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p. 497-514.
9. Romagnani S. Immunological tolerance and autoimmunity. Intern Emerg Med. 2006;1(3):187-96.
10. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. FASEB J. 2012;26(6):2253-76.
11. Borrego LM, Rosa S, Algueró C, Trindade H, Pinto JR. Célula Reguladoras. Lisboa: Revista Portuguesa de Pneumologia; 2007. p. 365-76.
12. La Cava A. Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity. Autoimmun Rev. 2008;8(1):83-7.
13. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin Exp Immunol. 2007;148(1):32-46.
14. Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. Trends Immunol. 2004;25(7):374-80.
15. Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. Neth J Med. 2006;64(1):4-9.
16. Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. Int Immunopharmacol. 2011;11(10):1489-96.
17. Read S, Powrie F. CD4+ regulatory T cells. 2001;13(6):644-9.
18. Rudensky AY, Gavin M, Zheng Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. Cell. 126. United States2006. p. 253-6.
19. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. Cell. 126. United States2006. p. 375-87.
20. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. 2001;27(1):68-73.

21. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15(4):430-5.
22. Kim JR, Chae JN, Kim SH, Ha JS. Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease. *J Korean Med Sci*. 2012;27(9):1009-13.
23. Watanabe K, Rao VP, Poutahidis T, Rickman BH, Ohtani M, Xu S, et al. Cytotoxic-T-Lymphocyte-Associated Antigen 4 Blockade Abrogates Protection by Regulatory T Cells in a Mouse Model of Microbially Induced Innate Immune-Driven Colitis $\nabla$ . *Infect Immun*. 762008. p. 5834-42.
24. Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*. 177. United States2006. p. 4376-83.
25. Allakhverdi Z, Fitzpatrick D, Boisvert A, Baba N, Bouguermouh S, Sarfati M, et al. Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*. 118. United States2006. p. 1342-9.
26. Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3603-10.
27. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 3. United States2002. p. 135-42.
28. Petrillo MG, Ronchetti S, Ricci E, Alunno A, Gerli R, Nocentini G, et al. GITR+ regulatory T cells in the treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2015;14(2):117-26.
29. Liao G, Nayak S, Regueiro JR, Berger SB, Detre C, Romero X, et al. GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 22. England2010. p. 259-70.
30. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 9. England2010. p. 482-93.
31. Lange C, Scholl M, Melms A, Bischof F. CD62L(high) Treg cells with superior immunosuppressive properties accumulate within the CNS during remissions of EAE. *Brain Behav Immun*. 25. United States: 2010 Elsevier Inc; 2011. p. 120-6.
32. Schmitt EG, Williams CB. Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Front Immunol*. 2013;4.
33. Dons EM, Raimondi G, Cooper DK, Thomson AW. Induced regulatory T cells: mechanisms of conversion and suppressive potential. *Hum Immunol*. 2012;73(4):328-34.
34. van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. Diversity of regulatory T cells to control arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(5):897-913.
35. Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally Induced Tregs - Role in Immune Homeostasis and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2013;4.
36. Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D, et al. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3+ regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(2):116-23.
37. Sega EI, Leveson-Gower DB, Florek M, Schneidawind D, Luong RH, Negrin RS. Role of Lymphocyte Activation Gene-3 (Lag-3) in Conventional and Regulatory T Cell Function in Allogeneic Transplantation. *PLoS One*. 92014.
38. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30(5):636-45.

39. Taylor A, Verhagen J, Akkoc T, Wenig R, Flory E, Blaser K, et al. IL-10 suppresses CD2-mediated T cell activation via SHP-1. *Mol Immunol.* 46. England2009. p. 622-9.
40. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med.* 2009;361(21):2033-45.
41. Alard P, Clark SL, Kosiewicz MM. Mechanisms of tolerance induced by TGF beta-treated APC: CD4 regulatory T cells prevent the induction of the immune response possibly through a mechanism involving TGF beta. *Eur J Immunol.* 2004;34(4):1021-30.
42. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. Interleukin-35-mediated induction of a novel regulatory T cell population. *Nat Immunol.* 2010;11(12):1093-101.
43. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2010;35(1):10-4.
44. Quintero OL, Amador-Patarroyo MJ, Montoya-Ortiz G, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J Autoimmun.* 2012;38(2-3):J109-19.
45. Bach JF. The etiology of autoimmune diseases: the case of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1274:33-9.
46. Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov Med.* 2011;12(67):535-45.
47. Parks CG, Miller FW, Pollard KM, Selmi C, Germolec D, Joyce K, et al. Expert Panel Workshop Consensus Statement on the Role of the Environment in the Development of Autoimmune Disease. *Int J Mol Sci.* 152014. p. 14269-97.
48. Stanford SM, Bottini N. PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nat Rev Rheumatol.* 10. United States2014. p. 602-11.
49. Boscarino JA. Posttraumatic stress disorder and physical illness: results from clinical and epidemiologic studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1032. United States2004. p. 141-53.
50. Cooper GS, Bynum ML, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun.* 33. England2009. p. 197-207.
51. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2. Netherlands2003. p. 119-25.
52. Tribolet de Abreu T, Silva NJ, Portelinha D, Santos E, Brito H, Barros MJ, et al. Internistas e Doenças Auto-imunes: Registo Nacional. ●Anular●Repetir●Negrito●Itálico●Sublinhado●Inferior à linha●Superior à linhaRevista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna. 2006;13(1):5-13.
53. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity.* 2008;41(2):123-32.
54. Bach J-F. The etiology of autoimmune diseases: the case of myasthenia gravis. Paris: Annals of the New York Academy of Sciences; 2012. p. 33-9.
55. Grant CR. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and—yet—unanswered questions. 2015;14(2):105–16.
56. Liu H, Leung BP. CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(5-6):519-24.
57. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Lin LH, Tsai CN. The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 2005;62(3):312-7.

58. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*. 1082006. p. 253-61.
59. Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *J Exp Med*. 1992004. p. 971-9.
60. Peck A, Mellins ED. Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol*. 2009;132(3):295-304.
61. Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, Smolen JS, Scheinecker C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(5):664-71.
62. Pereira da Silva JA. *Reumatologia Prática*. 2ª ed. Coimbra: Diagnóstico; 2005. p. 19.2-.22.
63. Willrich MA, Murray DL, Snyder MR. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res*. 2015;165(2):270-82.
64. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):38-46.
65. Bang SY, Lee KH, Cho SK, Lee HS, Lee KW, Bae SC. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. *Arthritis Rheum*. 2010;62(2):369-77.
66. Cooper GS, Miller FW, Germolec DR. Occupational exposures and autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2. Netherlands2002. p. 303-13.
67. Pattison DJ, Harrison RA, Symmons DP. The role of diet in susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol*. 31. Canada2004. p. 1310-9.
68. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(9):1580-8.
69. DGS. *Prescrição de Agentes Biológicos na Doenças Reumáticas*. 2011.
70. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2775-85.
71. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(2):360-7.
72. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF $\alpha$  Therapy. *J Exp Med*. 2002004. p. 277-85.
73. Blache C, Lequerre T, Roucheux A, Beutheu S, Dedreux I, Jacquot S, et al. Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4+CD25hi regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(10):1814-22.
74. Biton J, Boissier MC, Bessis N. TNF $\alpha$ : activator or inhibitor of regulatory T cells? *Joint Bone Spine*. 2012;79(2):119-23.



75. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(5):625-39.
76. Thiolat A, Semerano L, Pers YM, Biton J, Lemeiter D, Portales P, et al. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39+ regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(2):273-83.
77. Esensten JH, Wofsy D, Bluestone JA. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(10):560-5.
78. Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, van der Lei RJ, Bijzet J, Kluiver J, et al. Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs. *Genes Immun*. 2014;15(2):115-25.
79. Zaiss MM, Frey B, Hess A, Zwerina J, Luther J, Nimmerjahn F, et al. Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis. *J Immunol*. 2010;184(12):7238-46.
80. Wehrens EJ, van Wijk F, Roord ST, Albani S, Prakken BJ. Treating arthritis by immunomodulation: is there a role for regulatory T cells? *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(9):1632-44.
81. Tran DQ, Shevach EM. Therapeutic potential of FOXP3(+) regulatory T cells and their interactions with dendritic cells. *Hum Immunol*. 2009;70(5):294-9.
82. Tang Q. Pharmacokinetics of therapeutic tregs. *Am J Transplant*. 2014;14(12):2679-80.
83. Lu L, Lan Q, Li Z, Zhou X, Gu J, Li Q, et al. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1112014. p. E3432-40.
84. Wright GP, Notley CA, Xue SA, Bendle GM, Holler A, Schumacher TN, et al. Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(45):19078-83.
85. Brusko TM, Koya RC, Zhu S, Lee MR, Putnam AL, McClymont SA, et al. Human antigen-specific regulatory T cells generated by T cell receptor gene transfer. *PLoS One*. 2010;5(7):e11726.
86. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*. 28. United States2008. p. 687-97.
87. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med*. 5. United States2013. p. 173ra23.
88. Deng S, Xi Y, Wang H, Hao J, Niu X, Li W, et al. Regulatory effect of vasoactive intestinal peptide on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis. *Cell Immunol*. 265. United States: 2010 Elsevier Inc; 2010. p. 105-10.
89. Wang J, Huizinga TW, Toes RE. De novo generation and enhanced suppression of human CD4+CD25+ regulatory T cells by retinoic acid. *J Immunol*. 183. United States2009. p. 4119-26.
90. Notley CA, McCann FE, Inglis JJ, Williams RO. ANTI-CD3 therapy expands the numbers of CD4+ and CD8+ Treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):171-8.

91. Szema AM, Hamidi SA, Golightly MG, Rueb TP, Chen JJ. VIP Regulates the Development & Proliferation of Treg in vivo in spleen. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2011. p. 19.
92. Kavousanaki M, Makrigiannakis A, Boumpas D, Verginis P. Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):53-63.
93. Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M, et al. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood.* 1142009. p. 891-900.