

# Niveles y fenotipo de células T regulatorias en pacientes pediátricos con Lupus Eritematoso Sistémico

Barrionuevo S<sup>1</sup>, Gaddi E<sup>2</sup>, Brusco I<sup>3</sup>, Pringe A<sup>4</sup>, Balbaryski J<sup>2</sup>

## Resumen

**Introducción.** El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica, autoinmune, multisistémica, de etiología aún desconocida.

En el control de la excesiva activación inmune observada en el LES, están principalmente involucradas las células T CD4+ regulatorias FoxP3+CD25+/- (Tregs).

**Objetivo.** Determinar la asociación entre el número y fenotipo de células Tregs y parámetros clínicos e inmunológicos, en el LES pediátrico.

**Materiales y Métodos.** En 12 niños con LES en tratamiento, se estudió el nivel y fenotipo de las Tregs, y su asociación con hallazgos clínicos y pruebas de laboratorio utilizadas en la evaluación de la actividad de la enfermedad.

**Resultados.** Los niveles de linfocitos TCD4+FoxP3+CD25- de niños con LES presentaron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ), respecto a los del grupo control de niños sanos ( $4.9 \pm 2.6$  vs  $1.59 \pm 0.44$ ). Los porcentajes de la subpoblación CD4+FoxP3+CD25- en pacientes con enfermedad activa, fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ), que en el grupo con LES inactivo y el grupo control ( $5.92 \pm 3.23$  vs  $2.22 \pm 1.2$  vs  $1.59 \pm 0.44$ ). El incremento observado en este grupo de pacientes se asoció a una mayor positividad de los anticuerpos ensayados.

**Conclusión.** El aumento de Tregs con fenotipo CD4+FoxP3+CD25- observado en niños con LES activo estaría asociado a una capacidad regulatoria no completamente funcional.

**Palabras claves:** LES pediátrico, Tregs, autoanticuerpos

## Summary

**Introduction.** Systemic lupus erythematosus (SLE)

is a chronic, autoimmune, multisystemic, inflammatory disease of unknown etiology. In the control of the excessive immune activation observed in SLE, regulatory CD4+T-cells FoxP3+ CD25 +/- (Tregs), are mainly involved.

**Aim.** To determine the association between number and phenotype of Tregs and clinical and immunological parameters in the paediatric SLE.

**Materials and Methods.** In 12 children with SLE, all of them under treatment, levels and phenotype of Tregs and their association with clinical findings and laboratory tests used in evaluation of disease activity, were recorded.

**Results.** Levels of CD4+FoxP3+CD25- T-lymphocytes of children with SLE showed a significant increase ( $p < 0.05$ ), compared to those of control group ( $4.9 \pm 2.6$  vs  $1.59 \pm 0.44$ ). Percentages of CD4+FoxP3+ CD25- T-cells in patients with active disease were significantly higher ( $p < 0.05$ ), than in inactive SLE and control groups, respectively ( $5.92 \pm 3.23$  vs  $2.22 \pm 1.2$  vs  $1.59 \pm 0.44$ ). Increased cells levels recorded in this group were associated with greater positivity of tested antibodies.

**Conclusion.** The increase in Tregs with CD4+FoxP3+CD25- phenotype observed in children with active SLE would be associated with a not fully functional regulatory capacity.

**Key words:** paediatric SLE, Tregs, autoantibodies

## Introducción

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica, autoinmune y multisistémica. Si bien su etiología es aún desconocida, en el mecanismo etiopatogénico están principalmente involucradas la activación de células T autoreactivas, y la producción mediada por linfocitos B de inmunocomplejos y autoanticuerpos 1-5. Las células T CD4+ regulatorias (Tregs) con una acti-

<sup>1</sup> Bioquímica Hospital Zubizarreta

<sup>2</sup> Bioquímico/a Laboratorio Inmunología Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

<sup>3</sup> Médica Planta Sección Reumatología Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

<sup>4</sup> Sección Reumatología Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

**Dirección postal:** Jeanette Balbaryski. Bioquímica laboratorio Inmunología Hospital General de Niños Pedro de Elizalde. Montes de Oca 40 (1270) CABA. E.mail: jeanettebal@yahoo.com.ar

Trabajo recibido el 28 octubre 2020 y aprobado el 12 noviembre 2020

vidad inmunosupresora constitutiva, son una de las subpoblaciones más importantes involucradas en el control de una inapropiada o excesiva activación inmune. Si bien la función de las Tregs es central en el mantenimiento de la auto-tolerancia, la función regulatoria negativa, sostenida o excesiva, puede ser contraproducente, puesto que las Tregs pueden suprimir la respuesta inmune frente a tumores y virus<sup>6-9</sup>.

La expresión de la proteína FoxP3, junto con la del receptor de la cadena  $\alpha$  de la interleuquina 2 (CD25) por los linfocitos T CD4+, son usadas habitualmente en la identificación de Tregs. Sin embargo, fue demostrado que tanto la expresión de CD25 como de FoxP3 podrían ser inducidas sobre las células T CD4+ naïve, a través de la activación celular, haciendo dificultosa la identificación de linfocitos TCD4+FoxP3+ como células Tregs puras. Además, células con propiedades regulatorias también fueron encontradas en la subpoblación TCD4+FoxP3+CD25-, confirmando la heterogeneidad de las subpoblaciones de linfocitos T con funciones supresoras<sup>10-14</sup>.

El LES pediátrico representa entre el 15 y 20% del total de pacientes con LES, desarrollando los niños formas de enfermedad más graves y con un curso clínico más agresivo en comparación a los adultos. Anormalidades en las células T regulatorias probablemente contribuyan a la hiperactividad de los linfocitos T y B observada en pacientes lúpicos, si bien los reportes sobre el número y función de estas células en esta patología autoinmune son contradictorios<sup>15-20</sup>.

La profundización en este tema resulta relevante tanto por lo controversial de la información disponible, como por la escasez de estudios pediátricos, pudiendo tener un importante impacto en el diagnóstico y tratamiento de este tipo de enfermedades. En función de estas premisas, en este trabajo se propone determinar si existe algún tipo de asociación entre el número y fenotipo de células T regulatorias y parámetros clínicos e inmunológicos, en un grupo de pacientes pediátricos con LES en tratamiento, el estudio se realizó entre 2015 y 2018.

## Material y métodos

### Población

El grupo evaluado comprendió 12 niños con diagnóstico de LES, 11 mujeres, un varón, con edades entre 10 y 18 años, tratados en el Hospital General de Niños Pedro de Elizalde. En todos los pacientes, en una visita de seguimiento clínico-inmunológico habitual, el médico especialista, a través del interrogatorio, examen clínico completo y resultados de pruebas de laboratorio, determinó el nivel de actividad de la enfermedad. La cuantificación

de tal actividad fue realizada por medio del índice SLEDAI (SLE disease activity index), uno de los índices usados habitualmente en la práctica clínica y en protocolos de investigación<sup>21-24</sup>.

Al momento de la visita de seguimiento, se obtuvo una muestra de sangre venosa para la realización de los parámetros inmunológicos evaluados en este estudio, y las determinaciones bioquímicas generales de control. Todos los pacientes estaban en tratamiento con diferentes esquemas de agentes inmunosupresores, con un tiempo variable de aplicación del mismo.

Las muestras controles fueron obtenidas de 10 niños sanos que concurrieron al hospital para estudios de control de cirugías traumatológicas programadas.

El consentimiento y asentimiento informado fue obtenido tanto de todos los niños incluidos en el estudio como de sus padres. El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Institución (Res. 114/13).

### Inmunofenotipificación de Tregs

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas a partir de sangre venosa obtenida con anticoagulante EDTA.K2, mediante centrifugación en gradiente de densidad con el reactivo Ficoll-Hypaque. La inmunomarcación se realizó a partir de 2x10<sup>6</sup> CMSP. En el estudio de los marcadores de superficie se utilizaron los anticuerpos monoclonales CD4 (Piridin clorofila-PerCP) y CD25 (isotiocianato de fluoresceína-FITC), mientras que en la marcación intracelular se utilizó FoxP3 (ficoeritrina-PE), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). Los datos fueron adquiridos en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), y analizados mediante el software CellQuest (Becton Dickinson). Al menos 20000 LTCD4+ fueron adquiridos para el análisis de las células FoxP3+. Tanto en los pacientes como controles se determinaron además las poblaciones linfocitarias habituales, T totales CD3+, "helper" CD3+CD4+, citotóxicas CD3+CD8+, activadas CD3+HLADR+, linfocitos B CD19+ y células "Natural Killer" CD3-CD16/56+.

### Determinación de autoanticuerpos

Para la determinación de autoanticuerpos, niveles de inmunoglobulinas y de los factores C3 y C4 del complemento, se obtuvieron muestras de suero, que se mantuvieron refrigeradas hasta el momento de su cuantificación. Los factores antinucleares (FAN) y anti-ADN fueron ensayados por inmunofluorescencia indirecta, mientras que los antígenos nucleares extraíbles (ENA): Ro, La, Sm y RNP, por enzoinmunoensayo. El factor reumatoideo,

las inmunoglobulinas totales y los niveles de C3 y C4 se midieron mediante nefelometría (Image Beckman Coulter, USA).

### **Análisis estadístico**

Un análisis ordinario de varianza (ANOVA) y el test de Student-Newman-Keuls, fueron realizados para comparar los niveles de CD4+FoxP3+ y CD4+FoxP3+CD25+/-, las diferentes poblaciones linfocitarias y las pruebas serológicas, entre los diferentes grupos clínicos evaluados. Un valor  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## **Resultados**

### **Características clínicas y de tratamiento de la población estudiada**

En función del criterio clínico evaluado por el especialista y descrito en material y métodos, la población en estudio fue dividida en dos grupos. Seis pacientes se encontraban en una fase de inactividad de la enfermedad, mientras que los 6 restantes presentaban enfermedad activa. Ambos grupos presentaron un tiempo de evolución similar de su enfermedad lúpica, con un valor medio de 4,3 años desde el diagnóstico. El valor medio del índice SLE-DAI, calculado en los 12 pacientes fue 5.3, con valores máximo y mínimo de 12 y 0 respectivamente. El parénquima renal fue el órgano con mayor compromiso, observándose glomerulonefritis lúpica en 8 pacientes (67%), 4 con enfermedad activa y los restantes sin manifestación de actividad. El diagnóstico realizado por biopsia renal, mostró que 7 pacientes presentaron glomerulonefritis de grado IV y el restante grado II. En 5 de los 8 pacientes con glomerulonefritis se comprobó la presencia de proteínas en el examen de orina. Se observaron complicaciones hematológicas, en especial anemia y/o leucopenia, en 6 pacientes (50%). Manifestaciones neurológicas como cefalea, convulsiones y corea se observaron en 3 pacientes. Otros 3 presentaron alteraciones cutáneas, uno de los niños presentó compromiso articular, mientras que en otro se observaron complicaciones pulmonares. Es de destacar que la mayoría de los pacientes presentaron compromiso combinado de más de un órgano o sistema.

La hidroxicloroquina y los corticoides en 12 y 10 pacientes, respectivamente, fueron los inmunosupresores más utilizados, si bien en todos ellos se utilizaron combinaciones de agentes inmunosupresores. (Tabla 1).

### **Niveles incrementados de linfocitos TCD4+FoxP3+CD25- en sangre periférica de niños con LES.**

La expresión de FoxP3, uno de los marcadores

más específicos para Tregs, fue ensayado para determinar los niveles porcentuales de las células regulatorias en niños con LES. No se obtuvieron diferencias significativas al comparar los porcentajes de células CD4+FoxP3+ totales de los pacientes lúpicos frente al grupo control de niños sanos, observándose una acentuada dispersión alrededor del valor medio en los pacientes lúpicos (Fig.1). Cuando la co-expresión entre CD25 y FoxP3 fue testeada, no se encontraron diferencias significativas en la subpoblación CD4+FoxP3+CD25+ entre los pacientes lúpicos y el grupo control, mientras que los niveles porcentuales de las células CD4+FoxP3+CD25- se encontraron incrementados significativamente ( $p < 0.05$ ), en los niños con LES. En ambos casos también fue observada una marcada dispersión entre los valores máximo y mínimo de la distribución. (Fig.1).

### **Cambios en los niveles porcentuales de subpoblaciones de Tregs en pacientes con LES activo e inactivo**

Los niveles porcentuales de linfocitos regulatorios CD4+FoxP3+, y las subpoblaciones CD25+ y CD25-, fueron evaluados en la población de pacientes lúpicos divididos según el grado de actividad de la enfermedad, establecido según las manifestaciones clínicas presentes. Los niveles de células CD4+FoxP3+ totales del grupo de pacientes con enfermedad activa presentaron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ), respecto al grupo control de niños sanos y al grupo de pacientes con enfermedad inactiva. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de células CD4+FoxP3+ totales entre los pacientes con enfermedad inactiva y el grupo control (Fig.2). Los porcentajes de la subpoblación CD4+FoxP3+CD25- en los pacientes con enfermedad activa, fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que en el grupo con LES inactivo y con respecto al grupo control. Por el contrario, los niveles de la subpoblación CD4+FoxP3+CD25+ no arrojaron diferencias significativas entre los grupos analizados (Fig. 2).

Un gráfico de puntos representativo de las diferencias en los niveles porcentuales de linfocitos TCD4+FoxP3+ y las subpoblaciones CD25+ y CD25- en un paciente control y pacientes lúpicos con enfermedad inactiva y activa se observa en la Fig.3.

### **Niveles de autoanticuerpos e inmunoglobulinas totales en pacientes lúpicos con distinto grado de actividad de la enfermedad**

El comportamiento de la subpoblación de células CD4+FoxP3+ atípicas, CD25-, y el grado

**Tabla 1. Características clínicas y terapéuticas de la población evaluada.**

Característica	Valor
Edad, años, media $\pm$ DS	14.2 $\pm$ 3.5
Género, femenino/masculino, n (%)	11 (92%) / 1 (8%)
Tiempo estimado desde el diagnóstico, años, media $\pm$ DS	4.3 $\pm$ 3.7
SLEDAI, media $\pm$ DS	5.3 $\pm$ 4.6
Compromiso de órgano, n (%)	
Renal	8 (67%)
Hematológico	6 (50%)
Neurológico	3 (25%)
Piel/mucosas	3 (25%)
Articular	1 (8%)
Pulmonar	1 (8%)
Tratamiento, n (%)	
Hidroxicloroquina	12 (100%)
Corticoides	10 (77%)
Ciclofosfamida	6 (50%)
Azatioprina	3 (25%)
Anti-CD20	2 (17%)

de activación de la enfermedad, nos llevaron a comparar los niveles de dicha subpoblación con marcadores humorales y celulares habitualmente usados en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad lúpica.

Los 6 pacientes con enfermedad activa (100%) fueron positivos para al menos uno de los siete autoanticuerpos testeados (rango 1-5 anticuerpos/paciente), mientras que 4 de los 6 pacientes con LES inactivo, (66%), presentaron autoanticuerpos detectables (rango 1-3 anticuerpos/paciente).

Los niveles de inmunoglobulinas totales de los grupos con enfermedad activa e inactiva se encontraron significativamente incrementados respecto al grupo control. Contrariamente, los niveles de C4 presentaron una disminución significativa en am-

bos grupos respecto al grupo de niños sanos. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los niveles de C3 entre los grupos evaluados. No se obtuvieron diferencias en el cociente entre células "helper" y citotóxicas entre ambos grupos de pacientes. Los pacientes con LES activo presentaron niveles de células T activadas CD3+HLADR+ y de linfocitos B CD19+, significativamente incrementados respecto a los pacientes con enfermedad inactiva y al grupo control de niños sanos (Tabla 2).

### Discusión

Las células T regulatorias son fundamentales en el mecanismo de regulación de la respuesta inmune. Sin embargo, diversos trabajos muestran resultados opuestos en cuanto a su capacidad regulatoria

Figura 1. Niveles porcentuales de linfocitos T CD4+FoxP3+ totales, TCD4+FoxP3+CD25+ y TCD4+FoxP3+CD25-, en sangre periférica de niños con LES y en un grupo control. CMSP fueron teñidas con anticuerpos monoclonales anti CD4, anti CD25 y anti-FoxP3, y analizadas mediante citometría de flujo. Un ANOVA y el test de Student-Newman-Keuls fueron utilizados en el análisis estadístico. \*: p <0.05.

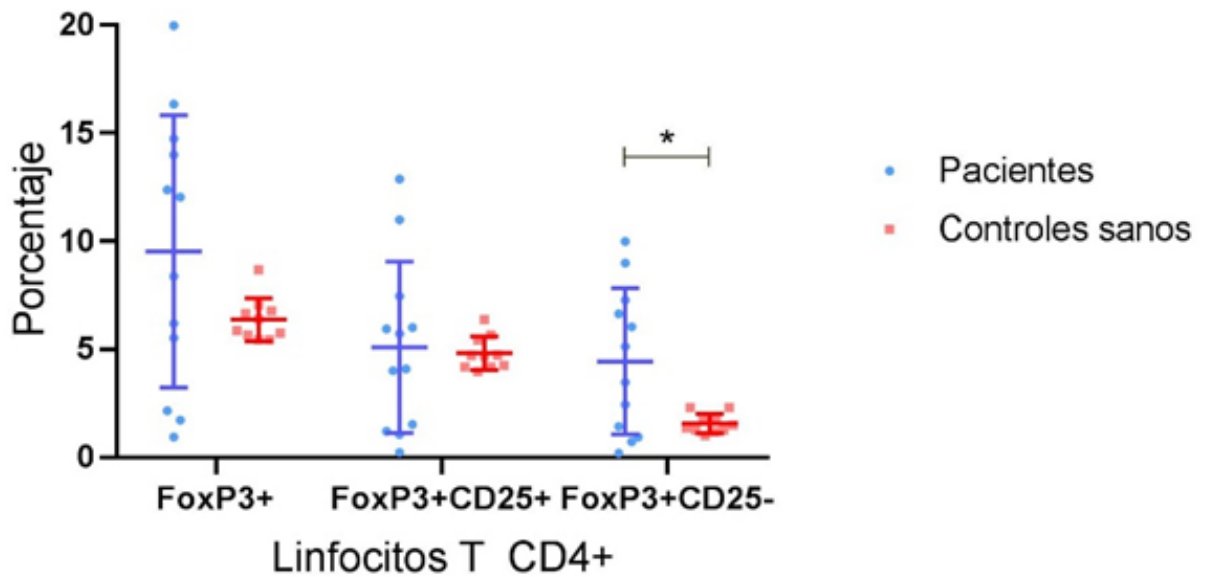
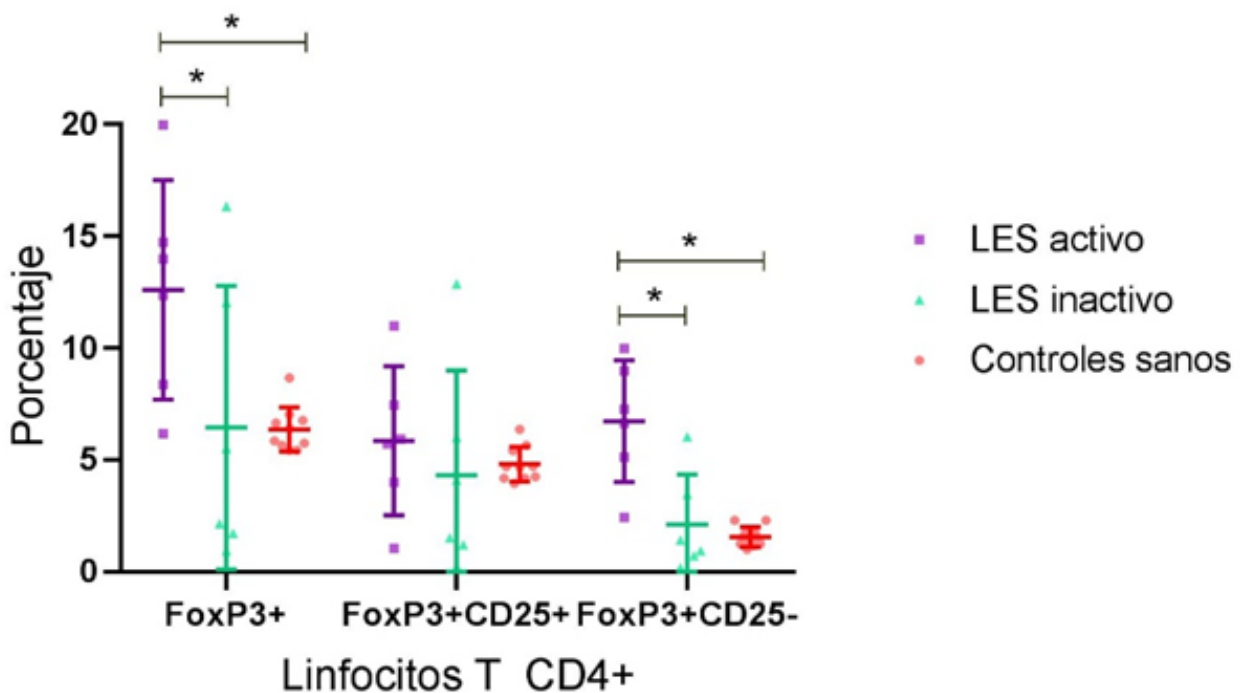
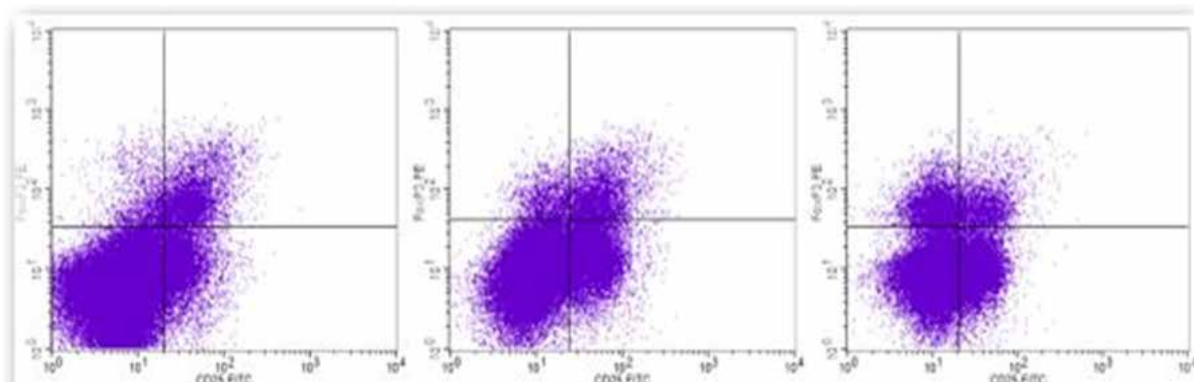


Figura 2. Niveles porcentuales de linfocitos TCD4+FoxP3+ totales, TCD4+FoxP3+CD25+ y TCD4+FoxP3+CD25-, en sangre periférica de niños con LES con enfermedad inactiva y activa, según fue definido en Materiales y Métodos, y en un grupo control. Un ANOVA y el test de Student-Newman-Keuls fueron utilizados en el análisis estadístico. \*: p <0.05.





**Figura 3. Perfil fenotípico representativo de células T regulatorias FoxP3+CD25+/- en un control sano (a) y pacientes con LES inactivo (b) y activo (c). Las figuras en el cuadrante superior izquierdo muestran los porcentajes de células CD4+FoxP3+CD25-, mientras que los porcentajes de las células CD4+FoxP3+CD25+ se muestran en el cuadrante superior derecho.**



en distintas patologías<sup>25-28</sup>. En la totalidad de niños con LES evaluados en el presente estudio se observó un incremento no significativo en el porcentaje de células regulatorias CD4+FoxP3+ respecto al grupo de niños sanos. Dicho incremento se realizó a expensas de la fracción de Tregs que ha perdido la capacidad de expresión de CD25, puesto que la fracción clásica CD4+FoxP3+CD25+, tampoco mostró diferencias significativas respecto al grupo de niños sanos. El aumento de Tregs con fenotipo CD4+FoxP3+CD25- observado en niños con LES estaría probablemente asociado a una actividad regulatoria no completamente funcional, actividad observada especialmente en pacientes que presentaron al momento de la evaluación, parámetros de inclusión en el grupo con enfermedad activa. Este aumento se observó tanto frente al grupo control de niños sanos, como a los pacientes con enfermedad inactiva. Probablemente, en este último grupo, la buena respuesta al tratamiento inmunosupresor, y la correcta adherencia al mismo, sea la causa del comportamiento similar al del grupo control.

Por otro lado, y desde el punto de vista de los estudios clásicos de inmunidad celular y humoral, la desregulación inmune presente en la población estudiada se pudo evidenciar de distinta forma. Fue notorio el mayor número de test positivos para alguno de los anticuerpos ensayados en los pacientes lúpicos con enfermedad activa, grupo que presentó a su vez, niveles incrementados de células LTCD4+FoxP3+CD25-. Asimismo, los niveles de inmunoglobulinas totales se encontraron francamente aumentados en todos los pacientes estudiados, reflejando la hiperactividad de los linfocitos B. Esta característica podría estar rela-

cionada con la falta de un incremento adecuado de células regulatorias, al aumento de la fracción con fenotipo atípico o incluso a cierta resistencia al tratamiento inmunosupresor aplicado. Diferentes autores han señalado que la disminución o la pérdida de expresión del CD25, receptor de IL2, probablemente esté afectando la capacidad funcional de las células regulatorias, y por lo tanto el incremento porcentual de Tregs CD25-, observado en pacientes con enfermedad activa, sería indicativa de esta falta de funcionalidad<sup>29-31</sup>. De todos modos, quedaría también por evaluar tanto el valor absoluto de estas células regulatorias atípicas, como su capacidad de regulación "in vitro" sobre la respuesta inmune, parámetros que no fueron evaluados en este trabajo. Sin embargo, el incremento porcentual tanto de la población de células B CD19+, como el de la población de células T activadas HLADR+, observado en los pacientes con enfermedad activa y con niveles incrementados de Tregs atípicas, confirmarían el desajuste en la adecuada respuesta inmune celular observada en estos pacientes, a pesar de estar la mayoría de ellos con diferentes esquemas de tratamiento y un tiempo prolongado de aplicación del mismo. En este punto es necesario recordar que los pacientes, todos con enfermedad de varios años de evolución, fueron evaluados por el especialista reumatólogo al momento de la realización del estudio. Los datos que permitieron el encasillamiento según la actividad del LES, fueron los de ese preciso momento, si bien la mayoría presentaba características clínicas ya detectadas en evaluaciones previas, o bien las mismas estaban en estado de remisión, o incluso algunos pacientes presentaron hallazgos clínicos de aparición reciente. Probablemente, el dispar

comportamiento en los niveles de las fracciones C3 y C4 del sistema complemento observado en este estudio, esté también afectado de un cierto sesgo, asociado al momento de evaluación del paciente. Por otro lado, el comportamiento errático de las mismas relacionado con la actividad de la enfermedad, resulta en datos bibliográficos conflictivos con respecto a la utilidad de tales fracciones como biomarcadores séricos de actividad de la patología lúpica<sup>32-33</sup>.

Una pregunta clave que surge en esta discusión, es si el incremento de las células regulatorias CD4+FoxP3+CD25- representa un mecanismo beneficioso frente al proceso autoinmune o, por el contrario, es parte del complejo mecanismo autoinmunitario causante del daño tisular observado en pacientes lúpicos. Se conoce que las células T regulatorias presentan una cierta plasticidad en particular en condiciones inflamatorias, pudiendo diferenciarse a células T patogénicas efectoras. Por otro lado, el origen, el preciso rol funcional, y el potencial patogénico de las poblaciones de células regulatorias no está todavía, suficientemente aclarado<sup>734-36</sup>. Si bien evaluar estas características excede los objetivos del presente trabajo descriptivo, el hecho de que, en la población estudiada, 5 de los 7 pacientes con glomerulonefritis grado IV, presentaron niveles de LTCD4+FoxP3+CD25- que duplicaron los observados en el grupo control (datos no mostrados), no deja de ser un hallazgo de interés. De todos modos, sería necesario analizar un mayor número de pacientes para poder estimar si existe alguna asociación entre los niveles sanguíneos de esta subpoblación de células CD4+FoxP3+ y el grado de deterioro de la función renal.

Consideramos que, si bien el comportamiento de varios de los parámetros ensayados muestra diferencia con datos aportados por la bibliografía, los resultados de este estudio son importantes puesto que no se cuenta con información suficiente de lo que ocurre en el curso de la enfermedad lúpica en pediatría. Por otro lado, sería de interés incrementar el número de pacientes y realizar su seguimiento, a fin de obtener de los datos humorales y celulares, pautas predictivas sobre la evolución del cuadro autoinmune. Asimismo, el análisis simultáneo clínico-inmunológico al debut de la enfermedad permitiría evaluar la distribución de las diferentes subpoblaciones de células regulatorias sin la interferencia de medicación inmunomoduladora, cuya acción terapéutica, probablemente condicione también, la marcada dispersión observada en los valores porcentuales de dichas células. Por último, otro interés adicional como consecuencia del tratamiento aplicado, sería asociar los cambios clínicos observados a las modificaciones cuantitativas en los niveles de células regulatorias.

La precisa evaluación clínica del paciente lúpico es necesaria puesto que la enfermedad presenta un fenotipo complejo, un curso variable y una morbilidad acumulativa en el tiempo, puesto que nuevos órganos y sistemas pueden ser afectados, incluso varios años posteriores al diagnóstico inicial. La determinación de nuevos parámetros inmunológicos como las Tregs, sus subpoblaciones y la evaluación funcional de las mismas podrían contribuir tanto al diagnóstico como al pronóstico de esta compleja patología.

**Tabla 2. Niveles de células TCD4+FoxP3+CD25+/-, autoanticuerpos, inmunoglobulinas totales, C3, C4, cociente LTCD4+/LTCD8+, células T activadas y linfocitos B, en pacientes lúpicos con enfermedad activa e inactiva, y en un grupo control de niños sanos.**

	LES activo (n:6)	LES inactivo (n:6)	Grupo Control (n:10)
CD4+FoxP3+CD25- (%)	5.92±3.23 <sup>a</sup>	2.22±2.13	1.59±0.44
No de tests positivos FAN	4	3	0
ADN	2	0	0
ENA (Ro, La, Sm, RNP)	8 <sup>b</sup>	1	0
RF No de tests > límite de detección (mediana IU/mL -rango)	3 22.96 (20-33)	1 20.6 (20-23)	0 <20 IU/mL
No de pacientes con hallazgos positivos al menos para un autoanticuerpo del total evaluados	6	4	0
Igs totales mg/dL (media ± DS)	1904 ± 521 <sup>c</sup>	1726 ± 599	1244 ±170
C3 mg/dL (media ± DS)	110.8 ± 57,8	95.6 ± 15,3	120±11
C4 mg/dL (media ± DS)	13.2 ± 8,2 <sup>d</sup>	12.2 ± 4,3	35±5
% LTCD4+ / % LTCD8+ (mediana-rango)	0.95 (0.43-1.94)	0.97 (0.32-1.53)	1.21 (1.17-1.25)
% LTCD3+HLADR+ (media ± DS)	16.8 ± 7.0 <sup>e</sup>	8.3 ± 5.8	7±3
% LBCD19+ (media ± DS)	18.7 ± 4.6 <sup>f</sup>	10.2 ± 6.2	13±4

<sup>a</sup> p<0.05, activo vs inactivo y control. <sup>b</sup> p<0.05, activo vs inactivo. <sup>c</sup> p<0.05, activo e inactivo vs control. <sup>d</sup> p<0.05, activo e inactivo vs control. <sup>e</sup> p< 0.05, activo vs inactivo y control. <sup>f</sup> p<0.05, activo vs inactivo y control.



## Bibliografía

1. Thong B, Olsen N. Systemic lupus erythematosus diagnosis and management. *Rheumatology* 2017;56: i3i13.
2. Tsokos G. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011; 365:2110 -21.
3. Feng X, Zou Y, Pan W, Wang X, Wu M, Zhang M, et al. Associations of clinical features and prognosis with age at disease onset in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2014 Mar;23(3):327-34. doi: 10.1177.
4. Aggarwal A, Srivastava P. Childhood onset systemic lupus erythematosus: how is it different from adult SLE?. *Int J Rheum Dis* 2015 Feb;18(2): 182-91.doi: 10.1111.
5. La Paglia G, Leone M, Lepri G, Vagelli R, Valentini E, Alessia Alunno A, et al. One year in review 2017: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35 (4): 551-561.Epub 2017 Jul 11.
6. Piccirillo C, d'Hennezel E, Sgouroudis E, Yurchenko E. CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of autoimmunity: in vivo veritas. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:655-62.
7. Chang X, Zheng P, Liu Y. Homeostatic proliferation in the mice with germline FoxP3 mutation and its contribution to fatal autoimmunity. *J Immunol* 2008; 181:2399-406.
8. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino C, Hafler D. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature* 2010; 10:490-500.
9. Buckner J. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunol* 2010; 10: 849-859.
10. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zanders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203:1693-700.
11. Zheng Y, Manzotti C, Burke F, Dussably L, Qureshi O, Walker L, et al. Acquisition of suppressive function by activated human CD4+ CD25- T cells is associated with the expression of CTLA-4 not FoxP3. *J Immunol* 2008; 181:1683-91.
12. Adeegbe D, Bayer A, Levy R, Malek T. Cutting edge: allogeneic CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells suppress autoimmunity while establishing transplantation tolerance. *J Immunol* 2006; 176:7149-53.
13. Nishioka T, Shimizu J, Lida R, Yamazaki S, Sakaguchi S. CD4+CD25+FoxP3+ T cells and CD4+CD25- Foxp3+ T cells in aged mice. *J Immunol* 2006; 176:6586-93.
14. Suen J, Li H, Jong Y, Chiang B, Yen J. Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009; 127:196-205.
15. Mina R, Brunner H. Update on differences between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2013; 21;15(4): 218.doi: 10.1186.
16. La Cava A. T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008;17(5):421-5. doi: 10.1177.
17. Bonelli M, Savitskaya A, Steiner C, Rath E, Smolen J, Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- FoxP3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2009; 182:1689-95.
18. Horwitz D. Identity of mysterious CD4+CD25- FoxP3+ cells in SLE. *Arthritis Res Ther* 2010, 12:101-3.
19. Lim H, Hillsamer P, Banham A, Kim C. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175:4180-83.
20. Zhang B, Zhang X, Tang F, Zhu L, Liu Y, Lipsky P. Clinical significance of increased CD4+CD25- FoxP3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67:1037-40. doi: 10.1136.
21. Aringer M. EULAR/ACR classification criteria for SLE. *Semin Arthritis Rheum* 2019; 49: S 14-S17.doi: 10.1016.
22. Gladman D, Ibañez D, Urowitz M. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *Journal of Rheumatology* 2002; 29: 288-291.
23. Lam G, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23: S120-S132.
24. Mosca M, Merrill J, Bombardieri S. Assessment of Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. In *Systemic Lupus Erythematosus*. Chapter 2, pages 19-23. Elsevier 2007
25. Fazekas de St Groth B, Landay A. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response? *AIDS* 2008; 22:671-83.
26. Moes N, Rieux-Laucat F, Begue B, Verdier J, Neveu B, Patey N, et al. Reduced expression of FoxP3 and regulatory T-cell function in severe forms of early- onset autoimmune enteropathy. *Gastroenterology* 2010; 139: 770-8

27. Emerging functions of regulatory T cells in tissue homeostasis. Sharma A, Rudra D. *Front Immunol* 2018; 9:1-25.
28. Arpaia N, Green J, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection. *Cell* 2015; 162: 1078-89.
29. Jacobi A, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, et al. Activated memory B subsets correlate with disease activity in Systemic Lupus Erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum* 2008; 58(6):1762-73.
30. Wing JB, Sakaguchi S. FoxP3(+) T(reg) cells in humoral immunity. *Int Immunol* 2014, 26: 61-9.
31. Jyh-Hong I, Li-Chieh W, Yu-Tsan L, Yao-Hsu Y, Dong-Tsamm L, Bor-Luen C. Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2006; 117: 280-6.
32. Birmingham D, Irshaid F, Nagaraja H, Zou X, Tsao B, Yu C, et al. The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare. *Lupus* 2010; 19:1272-80.
33. Gandino I, Scolnik M, Bertiller E, Scaglioni V, Cattogio L, Soriano E. Complement levels and risk of organ involvement in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus Science & Medicine* 2017; 4 doi 10.1136.
34. Yang X, Wang W, Xu J, Zhang M, Mei H, Shen Y, et al. Significant association of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells with clinical findings in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Transl Med* 2019; 7:93 doi 10.21037.
35. Josefowicz S, Lu L, Rudensky A. Regulatory T cells: mechanism of differentiation and function. *Ann Rev Immunol* 2012; 30:531-64.
36. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol* 2017; 17:703-17.