

Instituto Politécnico de Coimbra
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra
Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública

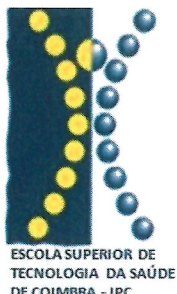


**Quantificação e caracterização fenotípica e funcional das células NK
do sangue periférico em Lúpus Eritematoso Sistémico (LES).**

Luís Filipe dos Santos Teixeira

Coimbra

2011



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Quantificação e caracterização fenotípica e funcional das células NK do sangue periférico em Lúpus Eritematoso Sistémico (LES).

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização em Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Augusto Paiva, equiparado a Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e Assessor da Carreira Técnica Superior de Saúde no Centro de Histocompatibilidade do Centro e co-orientação do Doutor António José Martinho Teixeira Gomes, Assessor Superior da Carreira Técnica Superior de Saúde no Centro de Histocompatibilidade do Centro.

Agradecimentos

Agradeço ao Doutor Artur Paiva e ao Doutor António Martinho Gomes pela competência com que orientaram esta minha tese, pela dedicação, pelo apoio, disponibilidade e partilha do saber.

Agradeço ao Doutor Luís Inês e ao Professor Doutor José António Pereira da Silva, pelo trabalho clínico e cedência das amostras dos doentes com diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistémico.

Agradeço a todos os membros da equipa do Dr. Artur Paiva e da equipa do Dr. António Martinho Gomes que generosamente se disponibilizaram para a concretização deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que se disponibilizaram para a cedência de amostras controlo para este estudo.

Agradeço à Doutora Maria Luísa Pais, directora do Centro de Histocompatibilidade do Centro, pela oportunidade de realização deste trabalho nesta prestigiada instituição.

Sou muito grato a todos os meus familiares pelo apoio e incentivo recebido para a concretização desta tese.

Júri

Mestre Armando José Cerejo Caseiro

Professor adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Prof. Doutor José António Pereira da Silva

Professor Associado com Agregação, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Prof. Doutor Artur Augusto Paiva

Professor adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e Assessor da Carreira
Técnica Superior de Saúde no Centro de Histocompatibilidade do Centro

Dr. António José Martinho Gomes Teixeira

Assessor Superior da Carreira Técnica Superior de Saúde no Centro de Histocompatibilidade do
Centro

Resumo

Introdução: O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença inflamatória crónica auto-imune que afecta múltiplos órgãos. A sua etiologia é multifactorial, em que a interacção entre factores genéticos, hormonais, ambientais e infecciosos leva à perda de tolerância imunológica e à produção de auto-anticorpos dirigidos principalmente contra antígenos nucleares, alguns dos quais participam nas lesões teciduais. As células NK através das suas capacidades citotóxicas e produção de citocinas inflamatórias podem influenciar as doenças auto-imunes. **Objectivos:** O objectivo deste estudo foi quantificar e analisar as características imunofenotípicas e funcionais das duas principais subpopulações de células NK nos pacientes com LES. **Material e Métodos:** Este estudo incidiu numa população de 44 indivíduos com diagnóstico de LES, dos quais 18 se encontravam na fase activa e 26 na fase inactiva da doença e em 30 indivíduos saudáveis, que constituíram o grupo controlo. Para este universo populacional, foi estudada a percentagem (%) e número absoluto de células NK, assim como das suas duas subpopulações, CD56^{dim} e CD56^{bright}, no sangue periférico e a frequência com que estes dois grupos celulares expressam o antígeno CD57 e o receptor de quimiocina CXCR3, e produzem interferon-gama (IFN- γ), factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α), granzima B e perforina, assim como a quantidade de proteína por célula (MIF – média de intensidade de fluorescência), por citometria de fluxo. **Resultados:** Os resultados obtidos revelam uma clara diminuição dos números absolutos e relativos de células NK nos doentes com LES, principalmente naqueles com doença activa, enquanto que as proporções dos subtipos de células NK, não foram afectadas. Nos pacientes com LES activo encontrámos uma baixa densidade de CXCR3 em ambos os subtipos de células NK e uma baixa frequência de células NK CD56^{dim} a expressar CXCR3. Para além disso, observámos que a expressão de granzima B nos dois grupos de doentes com LES está diminuída mas a percentagem de células NK a expressar granzima B e perforina está aumentada, especialmente na doença activa. Observou-se uma diminuição na percentagem de células NK CD56^{dim} e CD56^{bright} a produzir TNF- α e na sua expressão nas células NK CD56^{dim} na doença activa, enquanto que a expressão de IFN- γ nas células NK CD56^{bright} está aumentada em todos os pacientes com LES. **Conclusão:** Os nossos resultados sugerem que as células NK apresentam alterações funcionais e fenotípicas únicas, que são particularmente evidentes na doença activa, e podem afectar o desenvolvimento da doença.

Palavras-chave Lúpus Eritematoso Sistémico, doença inflamatória auto-imune, auto-anticorpos, células NK, citometria de fluxo, CD57, CXCR3, IFN- γ , TNF- α , granzima B, perforina.

Abstract

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease that affects multiple organs. Its etiology is multifactorial, where the interaction of genetic, hormonal, environmental and infectious factors lead to loss of immunological tolerance and production of autoantibodies directed mainly against nuclear antigens, some of which participate in tissue injury. NK cells through their cytotoxic capabilities and the production of inflammatory cytokines may affect autoimmune diseases. **Objectives:** The aim of this study was to quantify and analyze the immunophenotypic and functional characteristics of the two major NK-cell subsets in SLE patients. **Material and methods:** This study focused on a population of 44 individuals diagnosed with SLE, 18 in the active phase of the disease and 26 in inactive phase of the disease and 30 healthy subjects who constituted the control group. For this population universe, we studied the percentage (%) and the absolute number of NK cells in peripheral blood, as well as the two subpopulations of NK cells, CD56^{dim} and CD56^{bright}, and the frequency with which these two groups of cells express the CD57 antigen and chemokine receptor CXCR3, and produce interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), granzyme B and perforin, and the amount of protein per cell (MIF-mean fluorescence intensity), by flow cytometry. **Results:** The results obtained show a clear decrease in absolute and relative numbers of circulating NK cells in SLE patients, especially in those with active disease, while the proportions of both NK-cell subsets were unaffected. In active SLE we found a reduced CXCR3 density on both NK-cell subsets and a lower frequency of CXCR3-expressing CD56^{dim} NK cells. Furthermore, the cytoplasmatic granzyme B expression was decreased in both SLE patients but the percentage of cells expressing granzyme B and perforin was higher, particularly in active disease. We have found a significant drop in the percentage of CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells producing TNF- α and of its expression on CD56^{dim} NK cells in active disease, while IFN- γ expression on CD56^{bright} NK cells was increased in both SLE groups. **Conclusion:** Our findings suggest that NK-cell subsets exhibit unique phenotypic and functional changes that are particularly evident in active SLE, and they may have the potential to affect the disease outcome.

Keywords

Systemic lupus erythematosus, inflammatory autoimmune disease, autoantibodies, NK cells, flow cytometry, CD57, CXCR3, IFN- γ , TNF- α , granzyme B, perforin.

I – Índice

Agradecimentos.....	ii
Júri.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
I – Índice.....	vi
II – Lista de figuras.....	viii
III – Lista de tabelas.....	ix
IV – Lista de abreviaturas.....	x
1. Introdução.....	1
2. Objectivos.....	8
3. Artigo Científico submetido à revista Clinical Rheumatology.....	9
3.1. Resumo do artigo científico.....	10
3.2. Folha de rosto.....	15
3.3. Resumo e palavras-chave.....	16
3.4. Introdução.....	17
3.5. Material e métodos.....	19
3.5.1. Participantes do estudo.....	19
3.5.2. Pacientes	19
3.5.3. Controlos saudáveis	19
3.5.4. Aquisição das amostras e análise de dados por Citometria de fluxo....	20
3.5.4.1. Frequência de células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} e sua expressão de CD57 e CXCR3	20
3.5.4.2. Frequência de células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} produtoras de IFN- γ e TNF- α	20
3.5.4.3. Frequência de células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} produtoras de granzima B e perforina.....	21
3.5.5. Análise estatística.....	21
3.6. Resultados.....	22
3.6.1. População do estudo	22

3.6.2. Frequência e número absoluto de células NK e das suas principais subpopulações no sangue periférico.....	22
3.6.3. Frequência de células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} no sangue periférico a expressar CD57 e CXCR3.....	22
3.6.4. Frequência de células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} no sangue periférico a produzir IFN- γ e TNF- α após estimulação <i>in vitro</i>	22
3.6.5. Frequência de células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} no sangue periférico a produzir granzima B e perforina.....	23
3.6.6. Correlações entre a actividade do LES e o número e função das células NK.....	23
3.7. Discussão.....	25
3.8. Referências bibliográficas.....	29
3.9. Tabelas.....	33
3.10. Legendas das figuras.....	37
3.11. Figuras.....	38
4. Discussão.....	42
5. Conclusão.....	47
6. Referências bibliográficas.....	48

II – Lista de figuras

Figura 1. Hipótese do papel protector das células NK nas doenças auto-imunes.....	6
Figura 2. Hipótese do papel prejudicial das células NK nas doenças auto-imunes.....	7
Figure 1. Frequência de células NK CD56 ^{dim} no sangue periférico a produzir granzima B e perforina e quantidade de cada grânulo citotóxico por célula (MIF) nos indivíduos saudáveis e pacientes com LES (A e B, respectivamente). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$ (Teste de Mann-Whitney U): * ASLE versus NC; # ISLE versus NC; & ASLE versus ISLE.....	38
Figure 2. Correlações entre o SLEDAI e a proporção de células NK CD56 ^{bright} produtoras de TNF- α , a proporção de células NK CD56 ^{dim} a expressar CXCR3 e a expressão de CXCR3 nos dois subtipos de células NK. Os coeficientes de correlação de Spearman (r) e o significado estatístico (p) estão indicados no canto superior direito.....	39
Figure 3. Absolute numbers of peripheral blood CD56 ^{bright} and CD56 ^{dim} NK cells according to the expression levels of anti-dsDNA antibodies: negative, low positive (<20 IU), moderately positive (20-50 IU) and high positive (>50 IU) (A and B, respectively). *Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$	40
Figure 4. Frequency of peripheral blood CD56 ^{dim} NK cells producing granzyme B and perforin according to the expression levels of anti-dsDNA antibodies: negative, low positive (<20 IU), moderately positive (20-50 IU) and high positive (>50 IU) (A and B, respectively). *Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$	41

III – Lista de tabelas

Tabela 1. Dados clínicos dos 44 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico (LES).....	33
Tabela 2. Frequência (%) e número absoluto (células/ μ l de sangue) de células NK e das suas duas subpopulações, CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} , no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LES	34
Tabela 3. Frequência de células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} a expressar CD57 e CXCR3 e quantidade de CXCR3 por célula (MIF), no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LES	35
Tabela 4. Frequência de células NK CD56 ^{dim} e CD56 ^{bright} produtoras de IFN- γ e TNF- α e quantidade de cada citocina por célula (MIF), no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LES, após activação com PMA e ionomicina	36

IV – Lista de abreviaturas

ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity / citotoxicidade celular dependente de anticorpo

ACR – American College of Rheumatology / Colégio Americano de Reumatologia

ANAs – anti-nuclear antibodies / anticorpos antinucleares

APC – allophycocyanin / alofococianina

ASLE – active systemic lupus erythematosus / lúpus eritematoso sistémico activo

CCR7 – chemokine (C-C motif) receptor 7 / receptor 7 de quimiocina (CC)

CD – cluster of differentiation / cluster de diferenciação

CD62 L – adhesion molecule L-selectin / molécula de adesão L-selectina

CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand / ligando de quimiocina (CXC)

CXCR3 – chemokine (C-X-C motif) receptor 3 / receptor 3 de quimiocina (CXC)

DCs – dendritic cells / células dendríticas

DNAM-1 – DNAX accessory molecule-1 / DNAX molécula-1 acessória

dsDNA – double-stranded deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico de dupla cadeia

Fc γ RIIIa – receptor (RIIIa) for constant fraction of immunoglobulin's type G / receptor (RIIIa) para a fracção constante das imunoglobulinas do tipo G

FITC – fluorescein isothiocyanate / isotiocianato de fluoresceína

Ig G – immunoglobulin's type G / imunoglobulinas do tipo G

IFNs – interferons

IFN- α – interferon-alpha / interferon-alfa

IFN- γ – interferon-gamma / interferon-gama

IL – interleukin / interleucina

IP-10 – interferon- γ -inducible 10-kD protein / proteína 10-kD induzida pelo interferon-gama

ISLE – inactive systemic lupus erythematosus / lúpus eritematoso sistémico inactivo

kDa – kilodalton

K₃-EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid-tripotassium / Ácido etilenodiaminotetraacético-tripotássio

KIR – killer immunoglobulin-like receptors / receptores de membrana das células NK semelhantes a imunoglobulinas

LES – lúpus eritmatoso sistémico

MHC – major histocompatibility complex / complexo principal de histocompatibilidade

MIF – média de intensidade de fluorescência

MFI – mean fluorescence intensity / média de intensidade de fluorescência

mg – milligram / miligrama

ml – milliliter / mililitro

mM – millimolar / milimolar

NC – healthy individuals / indivíduos saudáveis

NCAM – neural cell adhesion molecule / molécula de adesão de célula neural

ng – nanogram / nanograma

NK – natural killer

NKG2A – natural killer cell lectin-like receptor 2A / receptor 2A tipo lectina de célula natural killer

NKG2D – natural killer cell lectin-like receptor 2D / receptor 2D tipo lectina de célula natural killer

NKp – natural killer cell related protein / proteína de célula natural killer

PB – peripheral blood / sangue periférico ou Pacific Blue (anti-CD3-PB antibody)

PBS – phosphate buffered saline / tampão fosfato salino

PC7 – phycoerythrin cyanine 7 / ficoeritrina cianina 7

pDCs – plasmacytoid dendritic cells / células dendríticas plasmocitóides

PE – phycoerythrin / ficoeritrina

PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate / forbol 12-miristato 13-acetato

RNA – ribonucleic acid / ácido ribonucleico

RNA-IC – RNA-containing immune complex / imunocomplexos contendo RNA

RPMI 1640 medium – Roswell Park Memorial Institute 1640 medium / meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640

SD – standard deviation / desvio padrão

SLE – systemic lupus erythematosus / lúpus eritematoso sistémico

SLEDAI – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index / Índice de actividade da doença Lúpus Eritematoso Sistémico

SPSS – Statistical Package for Social Sciences / programa estatístico para as ciências sociais

TGF- β – transforming growth factor-beta/ fator de crescimento transformante-beta

TNF- α – tumor necrosis factor-alpha / fator de necrose tumoral-alfa

vol – volume

μ g – microgram / micrograma

μ l – microliters / microlitros

% – percentage / percentagem

1. Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença inflamatória crónica auto-imune que afecta múltiplos órgãos. Essencialmente afecta mulheres jovens e o curso crónico da doença está associado a períodos de intensa actividade e outros de baixa actividade, inclusive de remissão.

O LES é uma doença com uma apresentação clínica extremamente variável, desde lesões na pele e mucosas até lesões severas no sistema nervoso central, rins e outros órgãos. (1,2)

A doença apresenta uma história natural imprevisível, sendo progressiva e potencialmente fatal, se não tratada. A etiologia e fisiopatologia do LES não estão completamente determinadas, sabendo-se que factores genéticos, hormonais, infecciosos e ambientais contribuem para a desregulação imunológica nela envolvida. (3)

O LES é caracterizado por várias anomalias imunológicas como são a produção de auto-anticorpos contra antígenos do núcleo celular (ANAs), a hiperactividade de células B e a sobreexpressão de interferons (IFNs).

O distúrbio imunológico principal nos doentes com LES é a produção de auto-anticorpos. Estes anticorpos são dirigidos para várias moléculas próprias do indivíduo que se encontram no núcleo, citoplasma, superfície celular, e também moléculas solúveis como as imunoglobulinas G (IgG) e factores de coagulação, que são possivelmente expostas pelo sistema imune como resultado de defeitos na clearance de células apoptóticas. Deste modo, defeitos nos mecanismos imunoregulatórios, como a eliminação de células apoptóticas e de imunocomplexos contribuem para o desenvolvimento do LES. Também tem sido referenciado que uma diminuição na actividade do complemento promove susceptibilidade à doença prejudicando a neutralização e remoção de imunocomplexos. A perda de tolerância imune, o aumento da carga antigénica, o excesso de células T auxiliaadoras, a mudança da resposta Th1 para Th2, e defeitos na supressão de linfócitos B, conduzem à hiperactividade dos linfócitos B e à produção de auto-anticorpos patogénicos, constituindo assim mecanismos que potenciam a doença e a sua perpetuação. (1,3,4)

O resultado da acumulação de imunocomplexos antígeno-anticorpo, característicos da doença, provoca reacções inflamatórias incluindo a produção de IFNs. A inflamação crónica pode levar a danos em múltiplos órgãos, com perda da sua função. (1,4)

As células Natural Killer (NK) derivam de precursores da medula óssea e apresentam-se como linfócitos grandes com numerosos grânulos citoplasmáticos. São linfócitos que pertencem ao sistema imune inato mas que também afectam a resposta imune adaptativa. Elas medeiam numa primeira fase a protecção contra infecções virais e provocam a lise de células transformadas sem sensibilização prévia e células revestidas de anticorpos. (5,6)

No Homem, as células NK são definidas pela expressão de CD56, isoforma 140-kDa da molécula de adesão de célula neural (NCAM), e pela ausência de expressão de CD3, e constituem aproximadamente 10% dos linfócitos do sangue periférico. Existem duas principais subpopulações de células NK, que foram definidas de acordo com a densidade de expressão de CD56 na superfície celular. As células NK CD56^{dim}, que constituem a maioria das células NK do sangue periférico (constituem aproximadamente 90% das células NK), apresentam uma expressão diminuída de CD56, expressam receptores KIR (killer immunoglobulin-receptors), CD16 (Fc γ RIIIa) receptor de baixa afinidade para a fracção constante das imunoglobulinas do tipo G responsável pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), produzem perforina e granzima. As células NK CD56^{bright} (constituem aproximadamente 10% das células NK), que expressam intensamente CD56 na sua superfície celular, não expressam receptores KIR nem CD16 (ou expressam em baixa densidade), apresentam baixa expressão de perforina e granzima, mas possuem CD25, uma subunidade α do receptor de alta afinidade para a interleucina 2 (IL-2). Estes dois tipos de células NK diferem na sua função e distribuição. As células NK CD56^{dim}, encontram-se mais representadas no sangue periférico, têm uma alta capacidade citolítica e secretam baixos níveis de citocinas, enquanto que as células NK CD56^{bright} encontram-se mais representadas nos tecidos linfóides secundários e nos locais de inflamação, produzem um maior número de citocinas, entre as quais o interferon-gama (IFN- γ) e o factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α), mas apenas adquirem citotoxicidade após activação prolongada. É concebível que as células NK CD56^{bright} podem afectar as doenças auto-imunes promovendo a activação dos linfócitos T no tecido linfóide e a subsequente resposta por parte dos linfócitos B. (1, 5-9)

As duas subpopulações de células NK também diferem na expressão de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas, que facilitam a sua migração para os tecidos linfóides e locais de inflamação. A activação da célula NK durante o reconhecimento da célula alvo é controlada pela integração de sinais a partir de KIR inibitórios e de activação. Quanto aos receptores de inibição, a ligação dos KIR e do receptor formado pelo dímero CD94/NKG2A às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, liberta sinais negativos que previnem a morte da célula alvo, evitando assim a destruição de tecidos com uma expressão normal de MHC de classe I. Por outro lado, o envolvimento de KIR activadores e dos receptores NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1 e NKG2D por ligandos cuja expressão é regulada por infecção, transformação ou stress celular, assim como a activação do receptor CD16 (Fc γ RIIIa) pela opsonização de complexos antígeno-anticorpo proporcionam a activação da célula NK. Dos receptores inibitórios mencionados acima, as células NK CD56^{bright} expressam altos níveis do complexo inibidor CD94/NKG2A, mas não expressam receptores KIR, os quais, em contraste são expressos pelas células NK CD56^{dim}. Ambos os subtipos de células NK expressam os receptores de activação NKG2D, NKp30 e NKp46, mas a expressão de CD16 está confinado ao subtipo CD56^{dim}. As células NK CD56^{bright} secretoras de citocinas expressam um repertório mais reduzido de receptores inibitórios do que as células NK CD56^{dim} citotóxicas. (6-8,10)

Por outro lado, as células NK CD56^{bright} expressam um repertório mais vasto de moléculas de adesão e receptores de quimiocina, que as células NK CD56^{dim}, como é o caso do CD62L (molécula de adesão L-selectina) e o receptor de quimiocinas CCR7, que permite o seu recrutamento do sangue para os tecidos linfóides e locais de inflamação (6,8). É de salientar que a infiltração de células NK nas lesões inflamatórias é sobretudo por células NK CD56^{bright}, contudo, as células NK CD56^{dim} também expressam receptores de quimiocinas que as podem guiar para os locais de inflamação, como é o caso do CXCR3.

O CXCR3 é um receptor de quimiocina transmembranar que é activado por três quimiocinas da família CXC que são, a CXCL9, CXCL10 e CXCL11. Estas quimiocinas encontram-se aumentadas na circulação em ambientes inflamatórios. A sua função principal é recrutar selectivamente células do sistema imunológico para os locais de inflamação. Nos últimos anos, fortes evidências experimentais e clínicas apoiam a ideia de que o CXCR3 está

envolvido no desenvolvimento de doenças auto-imunes, especialmente através da amplificação da inflamação nos órgãos alvo, induzindo assim o agravamento das manifestações clínicas. (11)

As células NK são activadas em resposta a diversos estímulos, nomeadamente pela ausência ou diminuição de expressão de moléculas MHC classe I nas células alvo, por citocinas produzidas por outras células do sistema imunitário, como a IL-2, IL-12, IL-15 ou IL-18, pela estimulação dos receptores de imunoglobulinas como o CD16 e pelos receptores de activação específicos das células NK. Estes sinais estimuladores para as células NK resultam numa resposta que envolve a produção de citocinas, como o $\text{INF-}\gamma$ e o $\text{TNF-}\alpha$, e a libertação de grânulos responsáveis pela citotoxicidade, como as granzimas e perforinas.

As quimiocinas e citocinas libertadas pelas células NK influenciam a iniciação e o desenvolvimento da subsequente resposta imune adaptativa. Deste modo, as funções das células NK devem ser cuidadosamente reguladas para prevenir lesões nos tecidos normais ou a libertação indiscriminada de citocinas, que poderá resultar numa inapropriada activação do sistema imune adaptativo. (6-13)

Juntamente com a produção de auto-anticorpos e a deposição de imunocomplexos, existem evidências emergentes que sugerem que as citocinas podem agir como “peças chave” na fisiopatologia do LES. As citocinas assumem um papel crítico na diferenciação, maturação e activação de células e também participam nos processos inflamatórios locais que medeiam as lesões dos tecidos no LES. Certas citocinas como IL-6, IL-10, IL-17, IFNs e o $\text{TNF-}\alpha$ estão intimamente ligados à fisiopatologia do LES. Estas citocinas podem servir de biomarcadores para monitorizar a actividade da doença e prever a sua severidade. Além disso, a manipulação destas citocinas pode fazer destas, potenciais alvos terapêuticos para o tratamento do LES. (14,15)

Os IFNs são proteínas com capacidade de suprimir a replicação viral. Vários mecanismos de como os IFNs podem contribuir para a fisiopatologia do LES têm sido propostos. Os imunocomplexos gerados a partir de auto-anticorpos e auto-antígenos levam à activação das células dendríticas (DCs) e portanto, reforçam a apresentação de antígenos e o aumento da secreção de IFNs, responsáveis pelos processos inflamatórios característicos dos doentes com LES. O $\text{INF-}\gamma$, ou interferon do tipo II, é o protótipo de citocina produzido pelas

células NK. Para além das suas capacidades antivirais e antitumorais também possui propriedades imunoreguladoras. O IFN- γ , promove a maturação das células dendríticas e o aumento de expressão de moléculas na superfície celular, como é o caso de moléculas de MHC de classe I e II e moléculas coestimuladoras. Encontra-se envolvido na activação dos macrófagos, promove a actividade das células NK, participa no controlo da proliferação, diferenciação e resposta das células T e B, promove a resposta Th1 e suprime a resposta Th2. (14,16)

O factor de necrose tumoral-alpha (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que pode ser expressa como um trímero na superfície celular ou na sua forma solúvel. Para além dos seus efeitos apoptóticos, o TNF- α pode ter um papel importante na diferenciação dos linfócitos T e B, das células dendríticas, e na activação dos macrófagos. Existem evidências que mostram que o TNF- α pode desempenhar um papel pró-inflamatório no LES. Os níveis séricos de TNF- α em doentes com lúpus na fase activa encontram-se elevados e estão intimamente relacionados com a actividade da doença e a expressão abundante de TNF- α foi demonstrada nos rins de indivíduos com nefrite lúpica. (14,17,18)

As células NK, por um lado podem afectar o desenvolvimento da autoimunidade através de vários mecanismos incluindo a supressão de infecções virais e por outro, potenciar subsequentes respostas auto-imunes pela modulação de respostas autoreactivas de outras células imunes ou mediando directamente danos nos tecidos. A expressão de ligandos para os KIRs de activação e de inibição presentes na membrana das células NK nos tecidos alvo, bem como o ambiente de citocinas modulam o limite da activação das células NK, permitindo diferentes respostas das células NK que poderão potenciar ou suprimir a resposta auto-imune. (4,7)

As células NK podem apresentar um papel imunoregulador (sobretudo as células NK CD56^{bright}), uma vez que podem participar na imunoregulação das respostas auto-imunes mediadas pelas células T e B através da libertação de citocinas, como é o caso do INF- γ e do TGF- β (factor de crescimento transformante-beta), ou indirectamente através de interacções bidireccionais com outras células do sistema imune inato como é o caso das células dendríticas (DCs). As células NK podem controlar a resposta imune adaptativa através da interacção com

as DCs, pela morte de DCs imaturas que apresentam auto-antígenos, e através da produção de IL-10. Esta citocina anti-inflamatória, em contraste com o IFN- γ , pode inibir as DCs. Deste modo, as células NK podem participar no controlo da doença auto-imune atenuando a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos e a proliferação de células T e B. Finalmente, as células NK podem controlar a activação dos macrófagos que são responsáveis pelas lesões nos tecidos através da inflamação crónica. (Figura 1) (4,6,7)

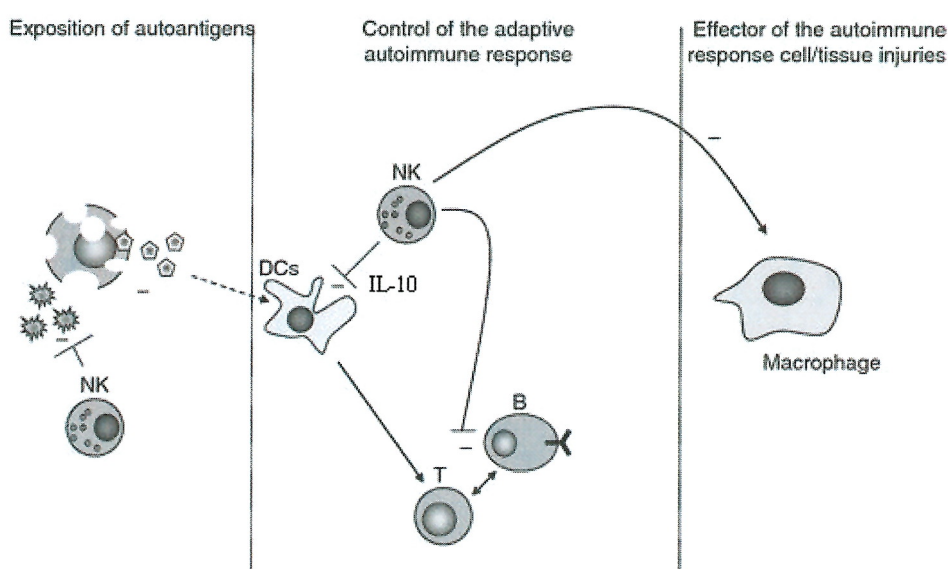


Figura 1: Hipótese do papel protector das células NK nas doenças auto-imunes. Retirada de: Schleinitz N, Vely F, Harle JR, Vivier E: Natural killer cells in human autoimmune diseases. Immunology 2010; 131(4):451-8.

Por outro lado, as células NK podem participar na indução e manutenção da reacção auto-imune. Primeiro, a citotoxicidade natural das células NK pode conduzir a uma exposição anormal de auto-antígenos que poderá levar à produção de auto-anticorpos. Segundo, durante a resposta imune adaptativa, elas podem induzir a maturação de células dendríticas apresentadoras de antígeno e induzir a diferenciação de monócitos em células apresentadoras de antígeno nos tecidos inflamados, aumentando assim a apresentação de auto-antígenos. As células NK também contribuem para a inflamação através da modulação da resposta imune

adaptativa Th1. Finalmente, as células NK podem directamente promover lesões nos tecidos durante a inflamação crónica em doenças auto-imunes exercendo os seus efeitos de citotoxicidade natural contra células que expressam ligandos activadores para os receptores de citotoxicidade natural das células NK, através da citotoxicidade celular dependente de anticorpo ou indirectamente através da activação dos macrófagos. (Figura 2) (4,6,7)

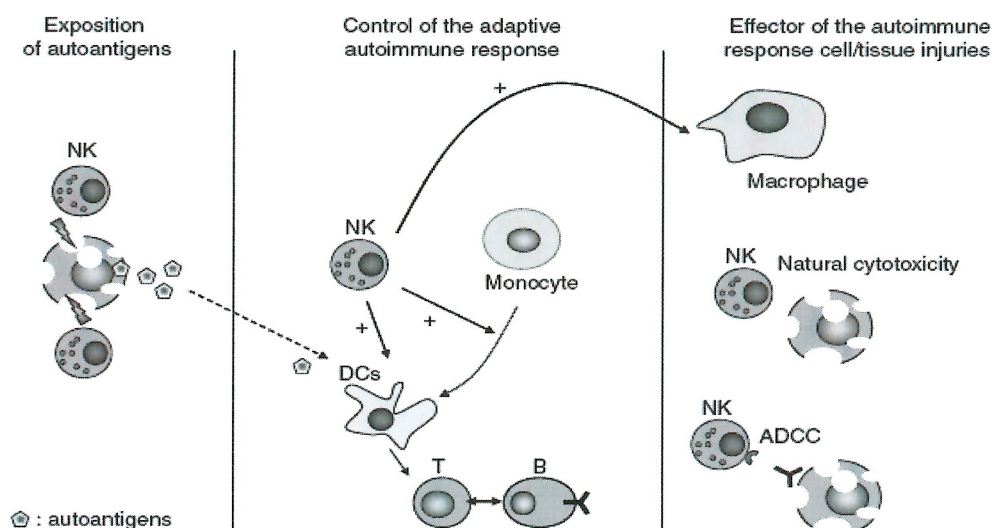


Figura 2: Hipótese do papel prejudicial das células NK nas doenças auto-imunes. Retirada de: Schleinitz N, Vely F, Harle JR, Vivier E: Natural killer cells in human autoimmune diseases. Immunology 2010; 131(4):451-8.

Variações quantitativas e qualitativas das células NK têm sido reportadas nas doenças auto-imunes, como é o caso do LES. Em vários casos de doença auto-imune, a redução no número de células NK circulantes tem sido verificado. Este defeito quantitativo está paralelamente associado com uma diminuição da citotoxicidade das células NK. Embora haja evidências substanciais que correlacionam a diminuição do número de células NK e da sua função com as doenças auto-imunes, não está claro se estas alterações ocorrem secundariamente à doença e ao tratamento ou se são defeitos primários envolvidos na fisiopatologia da doença.

A diminuição das células NK observada no sangue periférico de doentes com LES pode ser consequência da doença, através da activação crónica das células NK que levam à anergia e apoptose nestas células, através da realocização das células NK nos tecidos inflamados e/ou como consequência de defeitos intrínsecos das células NK ou na sua diferenciação. (4,6,19,20)

2. Objectivos

Este estudo teve como principal objectivo quantificar e caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as células NK em doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico, com alta e baixa actividade da doença, e comparar os resultados obtidos com um grupo controlo, e desta forma obter um melhor conhecimento acerca destas células na fisiopatologia da doença.

**3. Artigo Científico submetido à revista
Clinical Rheumatology**

3.1. Resumo do artigo científico

Introdução: O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença auto-imune multifactorial caracterizada por um largo espectro de manifestações clínicas, desde lesões na pele e mucosas até lesões severas no sistema nervoso central, rins e outros órgãos. A presença de elevados títulos de auto-anticorpos dirigidos principalmente contra antígenos nucleares (ANAs), o aumento de imunocomplexos circulantes, a deficiência do complemento e a sobreexpressão de IFNs são as principais características da doença. Contudo, a fisiopatologia e a etiologia do LES permanecem desconhecidas.

Para além, do seu importante papel na defesa do organismo contra tumores e alguns vírus, as células NK também podem participar na regulação das doenças auto-imunes, contudo, ainda existe alguma controvérsia relativamente ao seu papel, protector ou prejudicial, no LES. Apesar de evidências que correlacionam a diminuição do número e função das células NK com o LES, ainda permanece pouco claro se estas alterações nas células NK ocorrem secundariamente à doença e/ou ao tratamento ou se são defeitos primários envolvidos na fisiopatologia da doença.

No Homem, as células NK constituem aproximadamente 10% dos linfócitos do sangue periférico e incluem diferentes subpopulações, com diferente repertório KIR, função e localização. Elas podem ser divididas em dois principais subtipos, de acordo com a densidade de expressão de CD56 na superfície celular. As células NK CD56^{dim} compreendem 90% das células NK do sangue periférico, têm uma alta capacidade citolítica e produzem baixos níveis de citocinas, enquanto que as células NK CD56^{bright} são o principal tipo de células NK que encontramos no tecido linfóide secundário e nos locais de inflamação, produzem um maior número de citocinas, entre as quais o interferon-gama (INF- γ) e o factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α), mas adquirem citotoxicidade apenas após activação prolongada. Por esta razão, a infiltração de células NK nas lesões inflamatórias deve-se sobretudo ao subtipo CD56^{bright}, contudo, as células NK CD56^{dim} também expressam receptores de quimiocinas que as podem conduzir para os locais de inflamação. Os receptores de quimiocinas, cuja expressão é induzida em vez de constitutiva, como o CXCR3 (receptor para o CXCL9, CXCL10 e CXCL11), parecem desempenhar um papel predominante no controlo da inflamação. Nos últimos anos,

fortes evidências clínicas e experimentais suportam a ideia que o CXCR3 se encontra envolvido no desenvolvimento de doenças auto-imunes, especialmente através da amplificação da inflamação nos órgãos alvo, agravando assim as manifestações clínicas. Neste sentido, o estudo da expressão de CXCR3 poderá clarificar os mecanismos subjacentes que determinam a desregulação do sistema imune, como a inadequada activação ou tráfego das células NK. Além disso, considerando a estreita ligação de certas citocinas como os IFNs e o TNF- α com a fisiopatologia do LES, propusemo-nos avaliar a expressão destas citocinas nos dois subtipos de células NK à procura de uma possível relação entre a sua proporção e os parâmetros clínicos.

Neste estudo, avaliámos o fenótipo e função dos dois subtipos de células NK nos doentes com LES com doença inactiva e activa, com o propósito de obter um melhor conhecimento acerca destas células na fisiopatologia e controlo da doença.

Material e métodos: Este estudo incidiu numa população de 44 indivíduos com diagnóstico de LES, de acordo com os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1997, dos quais 18 se encontravam na fase activa da doença e 26 na fase inactiva da doença e em 30 indivíduos saudáveis, que constituíram o grupo controlo. Para este universo populacional, foi estudada a percentagem (%) e número absoluto de células NK no sangue periférico, assim como das duas subpopulações de células NK, CD56^{dim} e CD56^{bright}, e a frequência com que estes dois grupos celulares expressam o antígeno CD57 e o receptor de quimiocina CXCR3, e produzem IFN- γ , TNF- α , granzima B e perforina, assim como a quantidade de cada proteína por célula (MIF – média de intensidade de fluorescência), por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente usando o software estatístico SPSS – Program for Social Sciences 15.0. O teste de Mann-Whitney U foi usado com o intuito de comparar os diferentes grupos em estudo entre si e de apurar o significado estatístico das diferenças observadas entre eles, enquanto que o teste de Spearman foi utilizado com o intuito de detectar a associação entre os diferentes parâmetros em estudo. Qualquer valor de $p < 0.05$, foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados: Os resultados obtidos revelaram uma clara diminuição do número absoluto e relativo de células NK nos doentes com LES, principalmente naqueles com doença activa, enquanto que as proporções dos subtipos de células NK, CD56^{dim} e CD56^{bright}, não

foram afectadas comparativamente com os indivíduos saudáveis. Nos pacientes com LES activo encontrámos uma baixa densidade de CXCR3 em ambos os subtipos de células NK e uma baixa frequência de células NK CD56^{dim} a expressar CXCR3 e CD57. Para além disso, observámos que a expressão citoplasmática de granzima B nos dois grupos de doentes com LES está diminuída mas a percentagem de células NK a expressar granzima B e perforina está aumentada, especialmente na doença activa. Quanto ao padrão de secreção das citocinas IFN- γ e TNF- α no LES, observámos uma diminuição significativa da percentagem de células NK CD56^{dim} e CD56^{bright} a produzir TNF- α e da sua expressão nas células NK CD56^{dim} na doença activa. Observou-se, uma correlação negativa entre a frequência de células NK CD56^{bright} produtoras de TNF- α e o SLEDAI, assim como entre a frequência de células NK CD56^{bright} produtoras de TNF- α e os níveis séricos de anticorpos anti-dsDNA. Por outro lado, a expressão de IFN- γ nas células NK CD56^{bright} está aumentada em todos os pacientes com LES e correlaciona-se positivamente com a duração da doença.

Discussão: Neste estudo pudemos constatar que o número, actividade citotóxica, activação e tráfego das células NK encontram-se alterados no LES. De acordo com estudos anteriores, os nossos resultados demonstraram que os pacientes com LES apresentam uma baixa frequência e número absoluto de células NK circulantes no sangue periférico em comparação com os indivíduos saudáveis, principalmente em doença activa. No entanto, as populações de células NK CD56^{dim} e CD56^{bright} não foram afectadas. A diminuição de células NK circulantes no LES pode dever-se a vários factores, como a diminuição dos precursores de células NK, a sua susceptibilidade à apoptose induzida por moléculas de sinalização como o CD16 (Fc γ RIIIa), relacionada com a presença de imunocomplexos, assim como a influência de citocinas séricas, como o IFN- α , que pode mediar a morte de células NK. Além disso, a diminuição das células NK no sangue periférico dos pacientes com LES foi mais notória em doença activa possivelmente devido a deficiências das células NK e/ou à migração das células NK da corrente sanguínea para os locais de inflamação. Observámos também que os números de células NK e dos seus dois principais subtipos, no sangue periférico, correlacionam-se com vários parâmetros da actividade da doença, verificando-se uma diminuição significativa do número absoluto de células NK CD56^{dim} e CD56^{bright} nos doentes com LES que apresentam

anticorpos anti-dsDNA, comparativamente com os doentes com LES que não apresentam anticorpos anti-dsDNA.

Neste estudo, procurou-se explorar os mecanismos subjacentes à inapropriada activação e tráfego de células NK durante o curso da doença. Esta questão foi abordada através do estudo da expressão de CD57 e CXCR3 nos pacientes com LES com doença inactiva e activa. Observou-se que o antígeno CD57 foi expresso exclusivamente pelas células NK CD56^{dim}, como demonstrado em estudos anteriores, constituindo assim um marcador de citotoxicidade, enquanto que o receptor de quimiocina CXCR3 que promove a infiltração celular dos tecidos inflamados, é expresso por todas as células NK CD56^{bright} e parcialmente pelas NK CD56^{dim}. Observámos uma frequência reduzida de células NK CD56^{dim} no sangue periférico a expressar CD57 e CXCR3 nos pacientes com doença activa, relativamente aos indivíduos saudáveis. A diminuição da frequência de células NK CD56^{dim} CD57+CXCR3+ observada na fase activa da doença poderá corresponder a uma redistribuição e acumulação destas células nos locais de inflamação (devido às altas concentrações de ligandos de CXCR3 que circulam em ambientes inflamatórios, como ocorre no caso do LES) onde irão exercer as suas funções citotóxicas nos tecidos envolventes e consequentemente agravar a doença. A expressão de CXCR3 por célula também se encontra diminuída nos pacientes com LES activo em comparação com os pacientes com LES inactivo e com os indivíduos saudáveis. Estes resultados sugerem que a diminuição da expressão de CXCR3 nas células NK CD56^{dim} do sangue periférico dos pacientes com LES está relacionada com a actividade da doença e pode, portanto, representar um marcador de agravamento da doença.

Considerando que o estado de activação das células NK aumenta a sua capacidade citotóxica, mediada por várias vias apoptóticas, como a granzima/perforina, e estimula a rápida produção de citocinas (IFN- γ e TNF- α) e quimiocinas, este estudo revelou uma maior frequência de células NK CD56^{dim} a expressar granzima B e perforina, com uma diminuição da expressão de granzima B e sem diferenças significativas para a expressão de perforina nos pacientes com LES, principalmente naqueles que se encontram com doença activa. Também verificámos que níveis elevados de anticorpos anti-dsDNA estão relacionados com uma maior frequência de células NK CD56^{dim} a expressar granzima B e perforina no sangue periférico, o que pode ser explicado através da activação das células NK CD56^{dim} via CD16 (receptor para

a fracção constante das imunoglobulinas do tipo G) em função do aumento dos imunocomplexos circulantes. Relativamente à frequência de células NK CD56^{dim} e CD56^{bright} a produzir IFN- γ , observámos que as células NK CD56^{bright} de pacientes com LES são aquelas que produzem maiores quantidades desta citocina. O aumento da produção de IFN- γ pelas células NK CD56^{bright} nos pacientes com LES reforça o papel deste subtipo de células NK nos processos inflamatórios e na fisiopatologia da doença. Além disso, a frequência de ambos os subtipos de células NK a produzir TNF- α está diminuída no LES, sendo mais notória nas células NK CD56^{bright} dos pacientes com doença activa. Olhando para a expressão de TNF- α nas células NK, verificamos que esta encontra-se significativamente diminuída nas células NK CD56^{dim} nos doentes com LES na fase activa, em comparação com o grupo controlo. Este resultado pode ser explicado, mais uma vez pela, migração destas células para os tecidos inflamados, bem como pela presença de disfunções nas células NK ou pela activação crónica destas células.

Conclusão: Os nossos dados mostraram que as alterações numéricas e funcionais dos subtipos de células NK, CD56^{dim} e CD56^{bright}, estão associadas com a actividade da doença. Além disso, as células NK CD56^{bright} dos pacientes com LES parecem apresentar maior capacidade de produção de IFN- γ , o que pode contribuir para a desregulação do sistema imune no LES e agravar o estado inflamatório dos doentes. A expressão de CXCR3 nas células NK circulantes pode ser usada para avaliar a capacidade migratória destas células no LES, sugerindo uma importante diminuição da expressão deste receptor de quimiocina em ambos os subtipos de células NK na doença activa.

Em conjunto, os nossos resultados poderão contribuir para um melhor conhecimento acerca da contribuição das células NK na regulação recíproca entre a imunidade inata e adquirida no LES, e melhorar a nossa capacidade de utilizar estas células como marcadores de monitorização da actividade da doença e resposta ao tratamento.

3.2. Folha de rosto

Title

NK cells dysfunction in systemic lupus erythematosus: relation to disease activity.

Authors

Luís Teixeira³, Ana Henriques¹, Luís Inês^{2,4,5}, Tiago Carneiro¹, Ana Gonçalves¹, António Martinho¹, Maria Luísa Pais¹, José António Pereira da Silva^{2,5}, Artur Paiva^{1,3}

Institutions

¹ Centro de Histocompatibilidade do Centro. Coimbra, Portugal.

² Serviço de Reumatologia, Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

³ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Portugal.

⁴ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal.

⁵ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

Corresponding Author

Centro de Histocompatibilidade do Centro

Edifício São Jerónimo. 4º Piso, Praceta Mota Pinto

3001-301 Coimbra-Portugal

Fax: +351239480790 / Tel: +351239480700

apaiva@histocentro.min-saude.pt

Footnotes : Luís Teixeira and Ana Henriques are co-first authors.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

3.3. Abstract

Objective: Through their cytotoxic capacities and cytokine production, NK cells modulate autoimmune diseases. However, their role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) has not been extensively studied. The aim of this study was to analyze the immunophenotypic and functional characteristics of the two major NK-cell subsets in SLE and relate them with disease activity. **Methods:** Peripheral blood samples from 44 patients with active (n=18) and inactive SLE (n=26) and 30 controls were analysed by flow cytometry to evaluate NK-cell subsets, according to: the differential expression of CXCR3 and CD57; expression of granzyme B and perforin; and production of IFN- γ and TNF- α , after PMA/ionomycin activation. **Results:** A clear decrease in absolute and relative numbers of circulating NK cells was found in SLE, particularly in active disease, while the proportions of the major NK-cell subsets were unaffected. Active SLE was associated with a reduced CXCR3 expression on both NK-cell subsets and a lower frequency of CD56^{dim} NK cells expressing CXCR3. Furthermore, granzyme B expression was decreased in both SLE groups but the percentage of NK cells expressing granzyme B and perforin was higher, particularly in active disease. We found a significant decrease in the percentage of CD56^{brigh} and CD56^{dim} NK cells producing TNF- α and of its expression on CD56^{dim} NK cells in active disease, while IFN- γ expression on CD56^{brigh} NK cells was increased in both SLE groups. **Conclusions:** Our findings suggest that NK-cell subsets exhibit unique phenotypic and functional changes that are particularly evident in active SLE, and they may have the potential to affect the disease outcome.

Keywords: Systemic lupus erythematosus, NK cell subsets, CXCR3, cytokines, granzyme B

3.4. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial autoimmune disease characterized by a wide array of clinical manifestations, from skin and mucosal lesions to severe injuries in the central nervous system, kidneys and other organs [1, 2]. The presence of high titres of autoantibodies against nuclear components (antinuclear antibodies), elevated circulating immune complexes and complement deficiency are the main characteristics of the disease [2, 3]. However, the aetiology of SLE remains unknown and much of its pathogenesis is still to be unravelled. Nuclear autoantigens leading to antibody production in SLE are possibly exposed to the immune system due to disease-associated defects in the clearance of apoptotic cells [4-6]. Previous research also demonstrated an overactivation of the type I IFN pathway in patients with SLE and several other autoimmune diseases [7]. Some of these studies have shown that the IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells (pDCs) stimulated with RNA-containing immune complex (RNA-IC) can be upregulated by NK cells and inhibited by monocytes. These and other observations suggest that NK cells may participate in the regulation of SLE through several mechanisms, beyond their well-established role in host defense against malignancies and certain viruses [8, 9]. However, it remains controversial if NK cells have a disease-controlling or a disease-promoting role in SLE [10, 11].

Published evidence suggests that SLE is associated with decreased peripheral blood NK cell numbers and function [12, 13]. However, it remains unclear whether these changes reflect primary defects involved in the disease pathogenesis or if they are a consequence of the disease process and its treatments. The former interpretation has been reinforced by recent studies documenting NK cell defects in treatment-naïve and very early disease [14]. The possible mechanisms proposed to underlie this impairment included the presence of anti-lymphocyte antibodies, an intrinsic NK cell defect and/or a NK cell deficiency [15].

In humans, NK cells constitute approximately 10% of peripheral blood (PB) lymphocytes and include distinct subsets with disparate repertoires, location, function and developmental origin [16]. They can be split into 2 major subsets, based on the relative densities of CD56 surface expression. CD56^{dim} NK cells comprise 90% of peripheral blood

NK cells, have a high cytolytic capacity and secrete low levels of cytokines. Conversely, CD56^{bright} NK cells are the main type of NK cells in secondary lymphoid tissue and sites of inflammation, secrete a greater number of cytokines, including IFNs and tumoral necrosis factor alpha (TNF- α), but acquire cytotoxicity only after prolonged activation [17]. The predominant NK cell type in inflammatory lesions is CD56^{bright}, but NK cells CD56^{dim} also express chemokine receptors that may lead them to sites of inflammation [18]. Chemokine receptors whose expression is inducible rather than constitutive, such as CXCR3 (receptor for interferon- γ -inducible 10-kd protein [IP- 10], also designated CXCL10), appear to play a relevant role in the control of inflammation [19]. In recent years, strong experimental and clinical evidence support the concept that CXCR3 is involved in the development of autoimmune diseases, especially through the amplification of inflammation in target organs, thus causing a worsening of clinical manifestations [20].

In this context, we investigated the expression of CXCR3, CD57, granzyme B, perforin, as well as relevant cytokines, such as IFN- γ and TNF- α [21, 22], in NK cell subsets of patients with systemic lupus erythematosus (SLE), exploring their relationship with clinical parameters of the disease.

3.5. Material and methods

3.5.1. Participants

Seventy-four participants were enrolled in the study, comprising forty-four SLE patients, eighteen with active disease (100% female, mean age 33 ± 11 years), twenty-six with inactive disease (84% female, mean age 33 ± 10 years) and thirty age and gender-matched controls (90% female; mean age $\pm$ SD: 30 ± 6 years). The study protocol was approved by the local ethics committee, and all participants gave their signed informed consent.

3.5.2. Patients

A convenience sample of 44 patients fulfilling the 1997 American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for SLE was recruited from a University Hospital based Lupus Clinic [23].

Patients were evaluated according to the SLE Disease Activity Index 2000 (SLEDAI, 2k) [24, 25], and classified as having active (SLEDAI 2k ≥ 5 ; n = 18) and inactive disease (SLEDAI 2k < 5 ; n = 26) [25]. The patient's active medication at time of evaluation was recorded. Data regarding demographics, additional clinical parameters and active medication at the time of sample collection were recorded (Table 1).

3.5.3. Healthy Controls

The control group (NC) was composed of 30 healthy individuals. These participants were required to complete a brief questionnaire regarding previous or current medical conditions and medications. All were free from autoimmune disease, active infection and were not undergoing treatment with immunomodulatory drugs. All provided signed informed consent.

3.5.4. Flow cytometric data acquisition and analysis

3.5.4.1. Frequency of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells and their expression of CD57 and CXCR3

Quantification of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells subsets and the expression of CD57 and CXCR3 in these cells subsets was performed in K3-EDTA peripheral blood (PB) samples using anti-CD56 phycoerythrin cyanine 7 (PC7) (clone N901 (NKH-1); Beckman Coulter, Marseille, France), anti-CD3 Pacific Blue (PB) (clone UCHT1; BD Pharmingen, San Diego, C.A., USA), anti-CD57 fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone NK-1; BD Biosciences, San Jose, C.A., USA) and anti-CXCR3 phycoerythrin (PE) (clone 1C6/CXCR3; BD Pharmingen, San Diego, C.A. USA). Samples were incubated for 10 minutes at room temperature in darkness. After this incubation period a lyse and wash protocol was followed: ImunoPrep reagent (Beckman Coulter, Brea, C.A., USA) were added in Beckman Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter, Brea, C.A., USA) instrumentation. Cells were washed twice with 2 mL of phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in 0.75 mL of PBS (Gibco, Paisley, Scotland) before acquisition.

3.5.4.2. Frequency of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells producing IFN- γ and TNF- α

In vitro stimulation of PB NK cells was performed using 500 μ L of heparinised PB, diluted L/L (vol/vol), in RPMI-1640 medium (Gibco, Paisley, Scotland, UK), supplemented with 2 mM L-glutamine. 50 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma, Saint Louis, MO, USA), 1 μ g/mL of Ionomycin (Boehringer Mannheim, Germany) and 10 μ g/mL of Brefeldin A (Golgi plug- Sigma, Saint Louis, MO, USA) were added and the sample was incubated for 4 hours at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ concentration.

Each cultured PB sample was aliquoted and incubated with anti-CD56 PC7 (clone N901 (NKH-1); Beckman Coulter, Marseille, France), anti-CD3 Pacific Blue (PB) (clone UCHT1; BD Pharmingen, San Diego, C.A., USA) and anti-CD8 Allophycocyanin (APC) (clone B9.11, Beckman Coulter, Marseille, France). Then an intracytoplasmatic permeabilization protocol with IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and a staining protocol according to manufacturer's instructions were followed in order to analyse the intracellular expression of anti-IFN- γ FITC (clone 4S.B3; BD

Pharmingen, San Diego, C.A., USA) and anti-TNF- α FITC (clone MAb11; BD Pharmingen, San Diego, C.A., USA). Cells were resuspended in 0.75 mL of PBS (Gibco, Paisley, Scotland) before acquisition.

3.5.4.3. Frequency of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells expressing granzyme B and perforin

Quantification of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells subsets expressing granzyme B and perforin was performed in K3-EDTA PB samples using anti-CD56 PC7 (clone N901 (NKH-1); Beckman Coulter, Marseille, France), anti-CD3 PB (clone UCHT1; BD Pharmingen, San Diego, C.A., USA) and anti-CD8 APC (clone B9.11, Beckman Coulter, Marseille, France) following an intracytoplasmatic permeabilization protocol with IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and a staining protocol according to manufacturer's instructions in order to analyse the intracellular expression of anti-granzyme B PE (clone CLB-GB11; Pellicluster Amsterdam, Netherlands) and anti-perforin FITC (clone δ G9; BD Pharmingen, San Diego, C.A., USA). Cells were resuspended in 0.75 mL of PBS (PBS; Gibco, Paisley, Scotland) before acquisition.

Samples were acquired on Navios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, C.A., USA) using Navios acquisition Software (Beckman Coulter, Brea, C.A., USA). Data were analysed using Flow Cytometry Software Infinicyt 1.5 (Cytognos, Salamanca, Spain).

Absolute counts were calculated using a dual platform methodology (flow cytometry and haematological cell analyser).

The NK cells were defined as CD3- e CD56+ and the two subpopulations of NK cells were defined according to the density of expression of CD56, high or low, CD56^{bright} and CD56^{dim}, respectively.

3.5.5. Statistical Analysis

Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Differences between defined patient groups were assessed for statistical significance with the nonparametric Mann-Whitney U test. A Spearman's rank correlation was applied, to detect the association between different study parameters. *p* values below 0.05 were considered statistically significant. SPSS version 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, USA) was used to perform the statistical analyses.

3.6. Results

3.6.1. Population

The clinical features of patients are presented in Table 1.

3.6.2. Frequency and absolute number of NK cells and their major subsets in peripheral blood

Both the total number of NK cells and the percentage of lymphocytes they represent in the peripheral blood were significantly reduced in SLE patients (both active and inactive disease) than in controls. The difference was more pronounced in patients with active disease (Table 2). There were no statistically significant differences in the absolute number and frequency of NK cells between the active SLE and inactive SLE groups. The distribution of NK cells into the CD56^{bright} and CD56^{dim} NK subsets was similar in the three groups (Table 2).

3.6.3. Frequency of peripheral blood CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells expressing CD57 and CXCR3

The chemokine receptor CXCR3 was expressed in all CD56^{bright} NK cells and in a considerable fraction of CD56^{dim} NK cells (Table 3). In active disease we observed a lower frequency of CD56^{dim} NK cells expressing CXCR3 than in inactive disease and controls ($p=0.005$ and $p=0.001$, respectively) (Table 3). The frequency of CD56^{dim} NK cells expressing CD57 was also lower in active disease than in controls. Both NK-cell subsets from active SLE bear CXCR3 at lower density than those from controls (CD56^{bright} NK cells: $p=0.002$ and CD56^{dim} NK cells: $p=0.003$). The difference between active and inactive disease was also significant for CD56^{dim} NK cells ($p=0.015$) (Table 3).

3.6.4. Frequency of peripheral CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells producing IFN- γ and TNF- α , after *in vitro* stimulation

Regarding IFN- γ , our data showed that in NC and in both SLE groups, 26% to 35% of both NK-cell subsets secreted this cytokine, with no significant differences between the three study groups (Table 4). In addition, we observed higher levels of IFN- γ in CD56^{bright} cells

from SLE group compared to NC ($p < 0.05$), without significant differences in CD56^{dim} NK cells between the groups.

In contrast, as shown in Table 4, 35% of CD56^{bright} NK cells secreted TNF- α in NC, whereas in active disease less than 19% were secreting this proinflammatory cytokine ($p < 0.05$). Likewise, around 40% of CD56^{dim} NK cells produced TNF- α in NC with less than 26 to 22% of those cells producing TNF- α in inactive and active SLE ($p < 0.05$), respectively. The amount of TNF- α *per cell*, evaluated through mean fluorescence intensity of positive cells (MFI), was much higher for CD56^{dim} cells than in CD56^{bright} cells in both NC and SLE (Table 4). The cytoplasmatic levels of TNF- α on CD56^{bright} cells were similar in the three studied groups, but a significant decrease was noted in CD56^{dim} cells from active SLE (Table 4).

3.6.5. Frequency of peripheral CD56^{bright} NK cells and CD56^{dim} NK cells expressing granzyme B and perforin

Since only CD56^{dim} NK-cells expressed granzyme B and perforin, we focus our analysis in this cell subset, on the three studied groups (Fig. 1A). The proportion of these cells was significantly higher in active SLE compared to NC. A similar trend was observed for these NK specific granules in inactive SLE, but did not reach statistical significance (Fig. 1A).

In contrast, analysis of the amount of granzyme B expressed at single cell level demonstrated a significant decrease in inactive and active SLE compared to NC (Fig. 1B). No significant differences were found in the cytoplasmatic expression of perforin on CD56^{dim} NK-cell subset among the three groups (Fig. 1B).

3.6.6. SLE activity and NK cell numbers and function

The clinical parameters were used to test a possible association with NK cell number and function. We found a negative correlation between the SLEDAI and the absolute numbers of CD56^{bright} NK cells ($r = -0.41$, $p = 0.01$), while a trend toward a significant correlation was observed between the SLEDAI and the absolute numbers of CD56^{dim} NK cells ($p = 0.09$ by Spearman's rank correlation) (data not shown).

A negative correlation was also observed between SLEDAI and: 1. the proportion of TNF- α -producing CD56^{bright} NK cells; 2. the proportion of CXCR3-expressing CD56^{dim} NK

cells; and 3. the expression of CXCR3 on both NK-cell subsets (Fig. 2). Moreover, the absolute and relative numbers of NK cells and CD56^{dim} NK cell subset were positively correlated with the duration of disease (NK cells: $r = 0.455$, $p = 0.004$ and $r = 0.514$, $p = 0.001$; CD56^{dim} NK cells: $r = 0.433$, $p = 0.007$ and $r = 0.478$, $p = 0.002$), whereas absolute numbers of CD56^{bright} NK cells were negatively correlated with this parameter ($r = -0.405$, $p = 0.01$). We could also note in active SLE patients a positive correlation between the duration of disease and the levels of IFN- γ expression on CD56^{bright} NK cells ($r = 0.779$, $p = 0.001$) (data not shown).

As shown in Figure 3, when we grouped SLE patients based on the amount of anti-dsDNA antibodies in negative, low (<20 IU), moderate (20-50 IU), and high positive (>50 IU), we found that absolute number of both NK cell subsets was lower in the all groups with positivity to anti-dsDNA antibodies as compared to those without detectable levels of antibodies and the control group ($p < 0.05$). Another interesting finding was the increase frequency of peripheral blood CD56^{dim} NK cells producing granzyme B and perforin in SLE patients, mainly in those with high expression levels of anti-dsDNA antibodies when compared with control group ($p < 0.05$, Figure 4). Finally, a lower frequency of both TNF- α -producing CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells was observed in SLE patients with high and moderate expression levels of anti-dsDNA antibodies, when compared with those negative to these antibodies and with the control group ($p < 0.05$, data not shown).

A decreased expression of CXCR3 and higher of IFN- γ was found on CD56^{bright} NK cells in both groups of patients with and without cutaneous involvement comparatively to the control group ($p < 0.05$, data not shown). Conversely, lower frequencies of CD56^{dim} NK cells expressing CXCR3 and producing TNF- α together with an increase frequency of these NK cells producing perforin was observed in both patients groups as compared with the control group ($p < 0.05$, data not shown). Finally, a decrease frequency of CD56^{dim} NK cells expressing CD57 and increase of those producing granzyme B was also found in patients with cutaneous involvement vs control.

3.7. Discussion

In the present study, we found that NK cell number, cytotoxic activity, activation and/or trafficking patterns were altered in patients with SLE. Consistent with previous studies, our findings demonstrated that patients with SLE and more notorious in those with active disease share low frequency and absolute numbers of circulating NK cells when compared to healthy subjects [26, 27]. Despite this decreased absolute NK cell count noted in patients with SLE, the proportions of CD56^{bright} NK cells and CD56^{dim} NK cells were unaffected. Actually, depletion of circulating NK cells in SLE could be due to various factors, such as a reduction in the number of NK cell precursors and their susceptibility to ligand-induced apoptosis *via* signaling molecules such as CD16 (Fcγ receptor IIIa [FcγRIIIa]) related with the formation of immune complexes, as well as influence of serum cytokines, such as enhanced IFN-α serum levels, mainly produced by plasmacytoid dendritic cells that can also mediate the activation-induced cell death of NK cells [12, 26]. Moreover, the NK cell lymphopenia more marked in active disease may arise from NK cell deficiencies and/or due to some of the NK-cell subsets being edged out from the blood flow to target tissues. Here, we found that NK-cell and their subsets levels in peripheral blood were correlated with parameters of lupus activity, like, anti-dsDNA antibodies titer and the SLEDAI. Overall, absolute numbers of both CD56^{bright} NK and CD56^{dim} NK cell subsets were significantly decreased in SLE patients with detectable anti-dsDNA antibody levels as compared with those without anti-dsDNA antibodies. However, several investigators have described that reduction in NK cell activity was not correlated with serum immune complex levels or the activity of anti-lymphocyte antibodies in SLE [28, 29].

Here, we sought to explore the mechanisms underlying the inappropriate NK cell activation and/or trafficking observed in SLE through the study of CD57 and CXCR3 expression in patients with active or inactive SLE. We found that CD57 was exclusively expressed by CD56^{dim} NK cells, as previously observed [30, 31], playing as a cytotoxic marker, while the chemokine receptor CXCR3 assumed to promote cellular infiltration of inflamed tissues, was expressed by all CD56^{bright} NK cells and partially by CD56^{dim} NK cells. According to recent work, the expression of differentiation markers and NK-cell receptors showed that in the mature CD56^{dim} NK population, CD57 defines a subset of highly mature

cells representing long-lived cells that have encountered pathogens and represent human “memory” NK cells. Here, we found lower proportions of circulating CD56^{dim} NK cells expressing CD57 and CXCR3 as well as decreased expression levels of CXCR3 *per cell* in patients with active SLE as compared with those SLE patients with inactive disease and/or normal controls. Thus, these results suggest that the decrease of CXCR3 expression on both CD56 NK-cell subsets of SLE patients correlates well with disease activity and could therefore represent a marker of SLE flare. It is tempting to speculate that the decrease observed in the proportion of circulating CD57⁺CXCR3⁺ CD56^{dim} NK cells together with the decrease of CXCR3 expression *per cell* observed in active disease may correspond to a sustained CXCR3 internalization resultant from higher serum IP-10 levels described in SLE [32] and from a redistribution and accumulation of these active cells at sites of inflammation (due to high concentrations of ligands for CXCR3 circulating in the serum of patients), in this particular case, the kidneys and skin, where they will perform cytotoxic functions in the tissues concerned and consequently worsen the disease. In line with this hypothesis, we recently reported [33] higher levels of IP-10 mRNA expression on monocytes and CD14-/low CD16+ DC subpopulation in active SLE patients, which could reflect in the peripheral the tissue injury. Thus, there was a trend toward a negative correlation between the expression of CXCR3 on NK-cell subsets, as well as in the proportion of circulating CXCR3⁺ CD56^{dim} NK cells, and the SLEDAI. Interestingly, the changes that we had observed in this chemokine receptor on NK cells were not a result of the SLE treatment regimens since no significant differences in its expression were found in patients with active SLE receiving different doses of steroids and/or immunosuppressants.

Considering that activation status enhances NK cell cytotoxicity mediated by several apoptosis-inducing pathways, like perforin/granzyme, and stimulates rapidly cytokine (e.g. IFN- γ , TNF- α) and chemokine production, our results revealed a higher proportion of CD56^{dim} NK cells expressing granzyme B and perforin, with a decrease of granzyme B expression and no significant differences of perforin expression in SLE patients, especially in active SLE. We also verified that the higher serum titres of anti-dsDNA antibodies corresponds to an increase of CD56^{dim} NK cells proportions expressing granzyme B or perforin, which may be explained by the activation *via* CD16 (receptor for constant portion of

immunoglobulin G) of peripheral blood CD56^{dim} NK cells, due to the increase of circulating immune complexes, which could contribute for the inflammatory process and maintenance of the disease. This high representation of CD56^{dim} NK cells able to express granule-associated cytolytic effector molecules, mainly in active disease, demonstrates they functional activated phenotype in SLE. Although, the low levels of granules on the former cytotoxic NK-cells may reflect a lower sensitivity to the peripheral inflammatory environment, probably due to an impaired differentiation or an important NK cell lysis defect in patients with SLE [34].

Notably, despite the normal proportion of circulating CD56^{dim} NK cells and CD56^{bright} NK cells producing IFN- γ we revealed that CD56^{bright} NK cells from patients with inactive and active SLE produced higher levels of this cytokine. It is possible that in a disease context the responses of this latter subset of NK cells may be modulated resulting in the dysregulated production of proinflammatory cytokines rather than in immunoregulation reinforcing the potential detrimental role of this cell subset on the inflammatory process and disease pathogenesis. In addition, the proportion of both circulating NK-cell subsets producing TNF- α was decreased in SLE and more pronounced for CD56^{bright} NK cells from patients with active disease. Regarding TNF- α expression, a significantly reduced was observed on CD56^{dim} NK cells comparatively to the control group. In accordance with our recent studies [35, 36], this finding may be explained once more by the migration of these cells into inflamed tissues as well as by the association of NK cell dysfunction and excessive immune activation, which could contribute, potentially, to the initiation and maintenance of autoimmune responses. Moreover, TNF- α may represent a major therapeutic target in SLE, since significant differences in its expression were found in patients with SLE receiving different doses of steroids as compared to those without this treatment regimen.

Our data showed that NK cell subsets in patients with SLE display unique phenotypic and functional features associated with disease activity that could also reflect their capacities for trafficking. In summary, we might suggest that CD56^{dim} NK cells have a high turnover under disease conditions and have to be replaced, and consequently their precursor cells (CD56^{bright}) are released as recent immigrants from the bone marrow and/or the lymph nodes sharing a less differentiated phenotype. In turn, CD56^{bright} NK cells, a cell type with high cytokine-secreting ability, may contribute to the risk of developing SLE by the potentially

accumulation of these proinflammatory NK cells in target tissues. The full interpretation of such observations requires further studies on similar markers at the site of tissue inflammation and damage.

3.8. References

1. Ringold S, Lynn C, Golub RM (2011) JAMA patient page. Systemic lupus erythematosus. *Jama* 306:668.
2. Mok CC, Lau CS (2003) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56:481-90.
3. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ (2000) Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol* 76:227-324.
4. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR (1998) Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:1241-50.
5. Gaip US, Voll RE, Sheriff A, Franz S, Kalden JR, Herrmann M (2005) Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 4:189-94.
6. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau CS (2003) Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48:2888-97.
7. Meyer O (2009) Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine* 76:464-73.
8. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17:189-220.
9. Seaman WE, Sleisenger M, Eriksson E, Koo GC (1987) Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J Immunol* 138:4539-44.
10. Raulet DH (2004) Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 5:996-1002.
11. Horwitz DA, Gray JD, Ohtsuka K, Hirokawa M, Takahashi T (1997) The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-beta and implications for autoimmunity. *Immunol Today* 18:538-42.
12. Park YW, Kee SJ, Cho YN, *et al* (2009) Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 60:1753-63.

13. Schleinitz N, Vely F, Harle JR, Vivier E (2010) Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 131:451-8.
14. Yabuhara A, Yang FC, Nakazawa T, *et al* (1996) A killing defect of natural killer cells as an underlying immunologic abnormality in childhood systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 23:171-7.
15. Green MR, Kennell AS, Larche MJ, Seifert MH, Isenberg DA, Salaman MR (2005) Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus erythematosus: demonstration of a killing defect in patients. *Clin Exp Immunol* 141:165-73.
16. Hervier B, Beziat V, Haroche J, *et al* (2011) Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: excess interferon-gamma production in patients with active disease. *Arthritis Rheum* 63:1698-706.
17. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-40.
18. Sentman CL, Meadows SK, Wira CR, Eriksson M (2004) Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J Immunol* 173:6760-6.
19. Proudfoot AE: Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets (2002) *Nat Rev Immunol* 2:106-15.
20. Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H (2009) CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1173:310-7.
21. Yap DY, Lai KN (2010) Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *J Biomed Biotechnol* May 6 365083.
22. Avramescu C, Biciusca V, Daianu T, *et al* (2010) Cytokine panel and histopathological aspects in the systemic lupus erythematosus. *Rom J Morphol Embryol* 51:633-40.
23. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH (1992) Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35:630-40.
24. Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB (2002) Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 29:288-91.

25. Griffiths B, Mosca M, Gordon C (2005) Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 19:685-708.
26. Huang Z, Fu B, Zheng SG, Li X, Sun R, Tian Z, Wei H (2011) Involvement of CD226+ NK cells in immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 186:3421-31.
27. Erkeller-Yuksel FM, Lydyard PM, Isenberg DA (1997) Lack of NK cells in lupus patients with renal involvement. *Lupus* 6:708-12.
28. Goto M, Tanimoto K, Horiuchi Y (1980) Natural cell mediated cytotoxicity in systemic lupus erythematosus: suppression by antilymphocyte antibody. *Arthritis Rheum* 23:1274-81.
29. Struyf NJ, Snoeck HW, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ (1990) Natural killer cell activity in Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus: stimulation with interferons and interleukin-2 and correlation with immune complexes. *Ann Rheum Dis* 49:690-3.
30. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH (1989) Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143:3183-91.
31. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF (1983) Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 131:1789-96.
32. Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P (2003) Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 278:289-95.
33. Carvalheiro T, Rodrigues A, Lopes A, *et al* (2012) Tolerogenic versus Inflammatory Activity of Peripheral Blood Monocytes and Dendritic Cells Subpopulations in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:934161.
34. Hervier B, Beziat V, Haroche J, *et al* (2011) Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: excess interferon- γ production in patients with active disease. *Arthritis Rheum* 63:1698-706.

35. Henriques A, Ines L, Couto M, *et al* (2010) Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Immunol* 264:97-103.
36. Henriques A, Ines L, Carneiro T, *et al* (2011) Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 32:863-9.

3.9. Individual tables

Table 1. Clinical findings in 44 patients with systemic lupus erythematosus (SLE).

	Active SLE (n=18)	Inactive SLE (n=26)
Mean SLEDAI scores	9.7 ± 3.2	1.6 ± 0.9
Mean time since diagnosis	7.6 ± 7.4	9.0 ± 6.0
Lupus nephritis	44.4%	61.3%
Neurolupus	0%	19.4%
Lupus arthritis	66.7%	58.1%
Haematological involvement	100%	87.1%
Lupus skin disease	77.8%	74.2%
Severe Lupus*	44.4%	71%
Anti-dsDNA antibodies**		
Negative	11.1%	42.3%
Low positive	11.1%	32.3%
Moderately positive	22.2%	22.6%
High positive	55.6%	6.5%
Treatment		
Hydroxychloroquine	94.4%	87.1%
Immunosuppressants***	66.7%	32.3%
Steroids****	83.4%	12.9%
Low dose	38.9%	100%
Moderate dose	27.8%	0%
High dose	16.7%	0%

*Severe Lupus defined as cumulative major organ involvement; **Anti-dsDNA antibodies: Negative, <4.2 IU/ml. Low positive, <20 IU/ml. Moderately positive, 20-50 IU/ml. High positive, >50 IU/ml; ***azathioprine, mycophenolate mofetil, cyclosporine, tacrolimus, methotrexate, cyclophosphamide or rituximab; **** low dose, up to 10 mg/day; moderate dose, 10-30 mg/day; high dose, more than 30 mg/ day; n = sample size. Clinical parameters were evaluated from the beginning of the disease until the time of the study.

Table 2. Frequency (%) and absolute number (cells / μ l of blood) of circulating NK cells and of their two major subsets in healthy individuals and SLE patients.

		NC	ISLE	ASLE
NK	%	3.3 $\pm$ 1.8	1.8 $\pm$ 1.0 ^b	1.4 $\pm$ 1.2 ^a
	Cells/ μ l	240.0 $\pm$ 150.0	120.0 $\pm$ 80.0 ^b	90.0 $\pm$ 60.0 ^a
CD56 ^{bright}	%NK	6.2 $\pm$ 3.6	9.3 $\pm$ 8.1	7.6 $\pm$ 6.0
	Cells/ μ l	14.0 $\pm$ 7.0	9.0 $\pm$ 6.0	7.0 $\pm$ 6.0
CD56 ^{dim}	%NK	93.8 $\pm$ 3.6	90.7 $\pm$ 8.0	92.4 $\pm$ 6.1
	Cells/ μ l	220.0 $\pm$ 150.0	110.0 $\pm$ 70.0	80.0 $\pm$ 60.0

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

% = Percent of cells from total PB; %NK = Percent of cells for total NK cells.

NC, healthy individuals; ASLE, active disease; ISLE, inactive disease.

Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test):

^aASLE versus NC; ^bISLE versus NC.

Table 3. Frequency of NK-cell subsets expressing CD57 and CXCR3, and expression levels of CXCR3 *per cell*, in peripheral blood of healthy individuals and SLE patients.

			NC	ISLE	ASLE
CD56^{bright}	CXCR3	%	100	100	100
		MFI	27.1 ± 8.5	22.9 ± 11.0	18.9 ± 7.2 ^a
CD56^{dim}	CD57	%	40.5 ± 16.6	35.0 ± 16.9	28.7 ± 14.3 ^a
		%	31.0 ± 21.3	24.1 ± 12.4	12.5 ± 8.6 ^{a,c}
	CXCR3	MFI	18.5 ± 6.2	17.2 ± 7.1	13.3 ± 1.9 ^{a,c}

Results are expressed as mean ± standard deviation.

% = Percentage of positive cells; MFI = Mean Fluorescence Intensity of positive cells.

NC, healthy individuals; ASLE, active disease; ISLE, inactive disease.

Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test):

^aASLE versus NC; ^cASLE versus ISLE.

Table 4. Frequency of NK-cell subsets producing IFN- γ and TNF- α and amount of each cytokine *per cell*, in peripheral blood of healthy individuals and SLE patients.

			NC	ISLE	ASLE
CD56^{bright}	IFN-γ	%	26.8 $\pm$ 13.6	34.5 $\pm$ 19.9	29.1 $\pm$ 14.5
		MFI	26.1 $\pm$ 13.0	33.3 $\pm$ 14.0 ^b	37.1 $\pm$ 14.0 ^a
	TNF-α	%	35.0 $\pm$ 20.4	28.3 $\pm$ 12.1	18.5 $\pm$ 12.9 ^{a,c}
		MFI	47.2 $\pm$ 19.0	55.1 $\pm$ 27.4	43.4 $\pm$ 17.1
CD56^{dim}	IFN-γ	%	29.9 $\pm$ 18.3	26.2 $\pm$ 18.2	27.6 $\pm$ 16.0
		MFI	30.0 $\pm$ 13.0	34.1 $\pm$ 17.0	38.2 $\pm$ 25.1
	TNF-α	%	40.4 $\pm$ 21.9	25.6 $\pm$ 12.6 ^b	21.5 $\pm$ 16.8 ^a
		MFI	94.1 $\pm$ 45.2	84 $\pm$ 35	65 $\pm$ 27 ^a

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

% = Percentage of positive cells; MFI = Mean Fluorescence Intensity of positive cells.

NC, healthy individuals; ASLE, active disease; ISLE, inactive disease.

Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test):

^aASLE versus NC; ^bISLE versus NC; ^cASLE versus ISLE.

3.10. Legends

Figure 1. Frequency of peripheral blood CD56^{dim} NK cells producing granzyme B and perforin and amount of each granule-associated cytolytic effector molecules *per cell* (MFI) in healthy individuals and SLE patients (A and B, respectively). Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test): *ASLE versus NC; #ISLE versus NC; &ASLE versus ISLE.

Figure 2. Correlations between SLEDAI and the proportion of TNF- α -producing CD56^{bright} NK cells, the proportion of CXCR3-expressing CD56^{dim} NK cells and the expression of CXCR3 on both NK-cell subsets. The Spearman correlation coefficients (r) and statistical significance (p) are indicated on the upper right corner.

Figure 3. Absolute numbers of peripheral blood CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells according to the expression levels of anti-dsDNA antibodies: negative, low positive (<20 IU), moderately positive (20-50 IU) and high positive (>50 IU) (A and B, respectively). *Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$.

Figure 4. Frequency of peripheral blood CD56^{dim} NK cells producing granzyme B and perforin according to the expression levels of anti-dsDNA antibodies: negative, low positive (<20 IU), moderately positive (20-50 IU) and high positive (>50 IU) (A and B, respectively). *Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$.

3.11. Figures

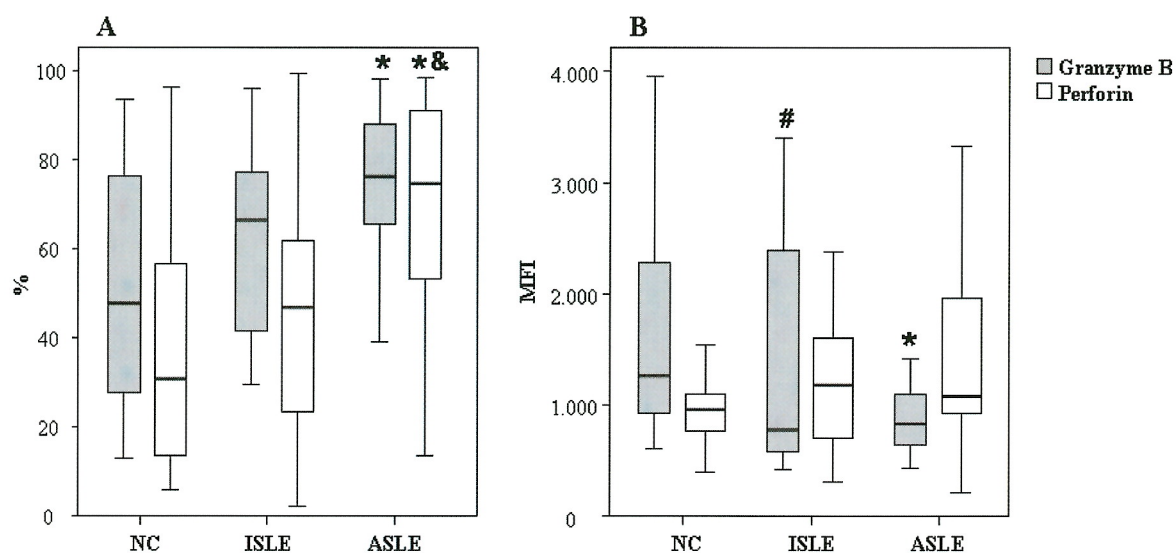


Figure 1. Frequency of peripheral blood CD56^{dim} NK cells producing granzyme B and perforin and amount of each granule-associated cytolytic effector molecules *per cell* (MFI) in healthy individuals and SLE patients (A and B, respectively). Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test): * ASLE versus NC; [#]ISLE versus NC; &ASLE versus ISLE.

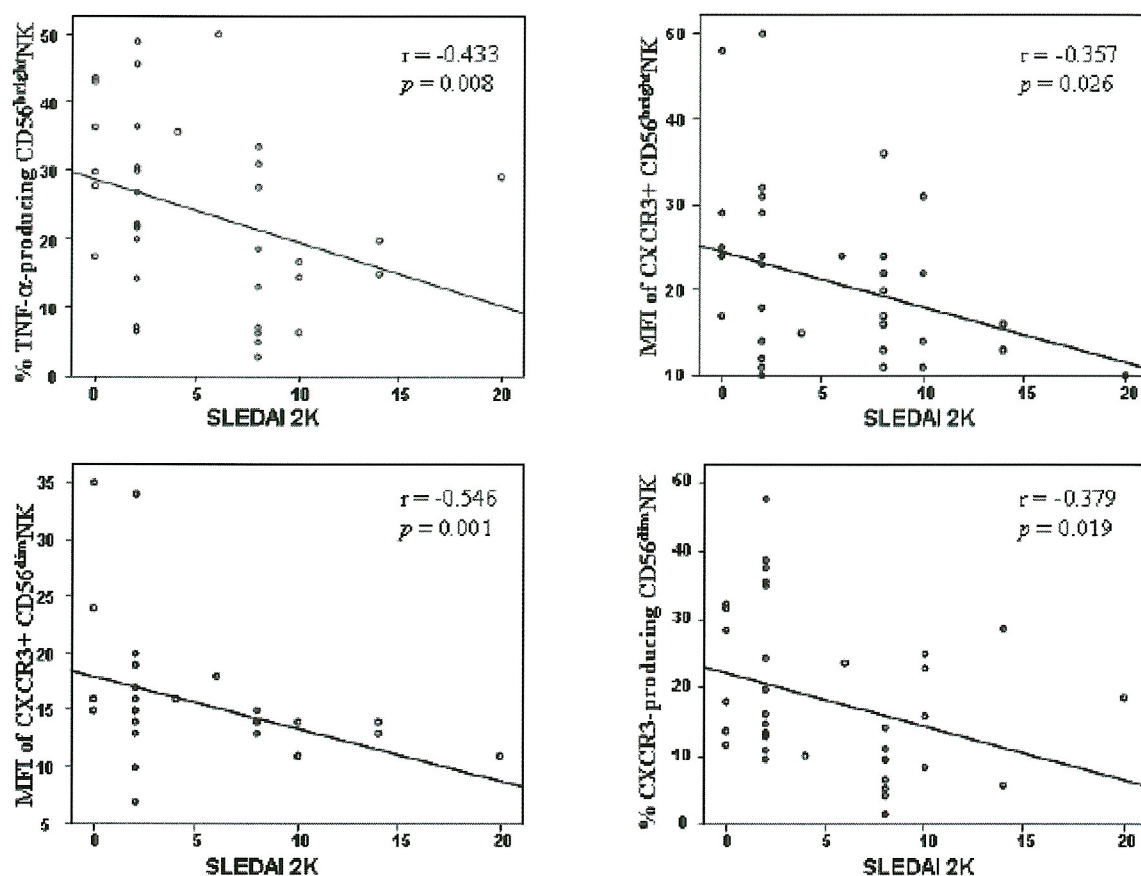


Figure 2. Correlations between SLEDAI and the proportion of TNF- α -producing CD56^{bright} NK cells, the proportion of CXCR3-expressing CD56^{dim} NK cells and the expression of CXCR3 on both NK-cell subsets. The Spearman correlation coefficients (r) and statistical significance (p) are indicated on the upper right corner.

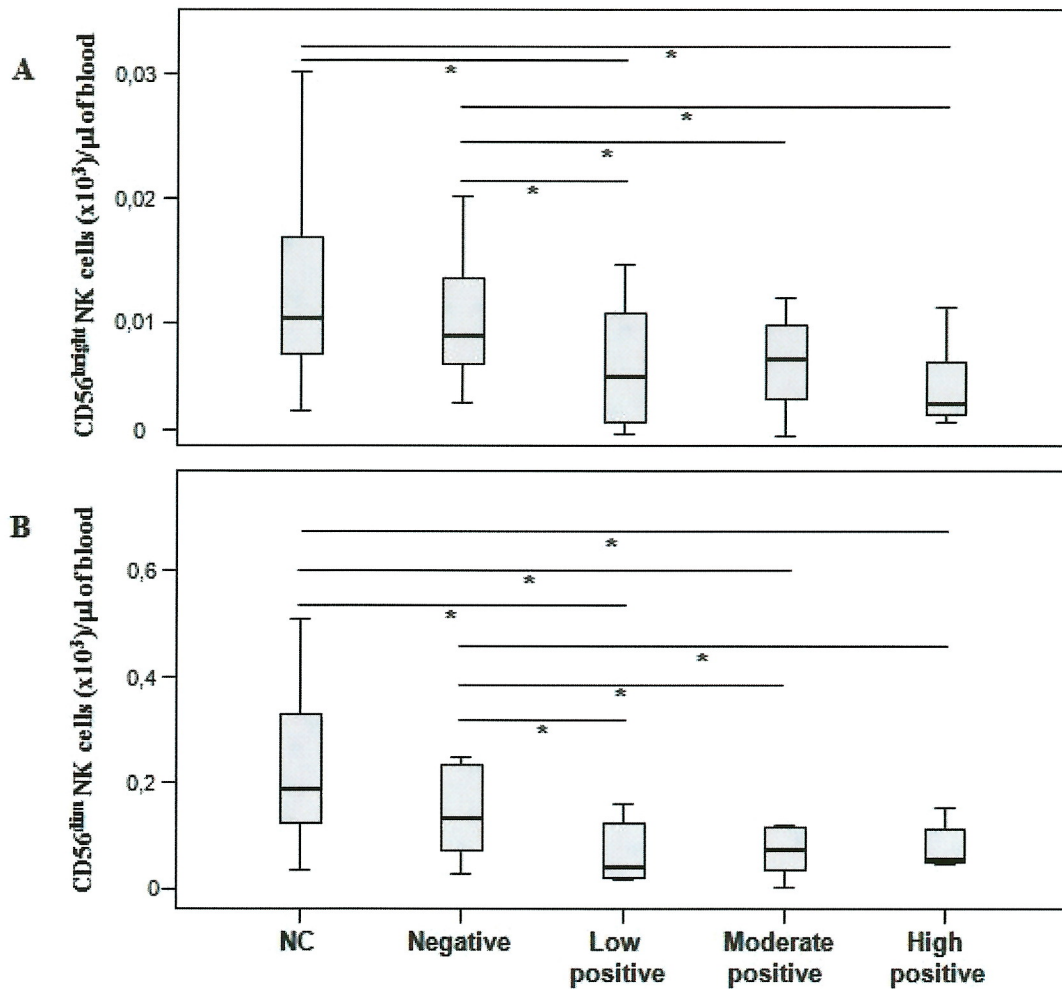


Figure 3. Absolute numbers of peripheral blood CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells according to the expression levels of anti-dsDNA antibodies: negative, low positive (<20 IU), moderately positive (20-50 IU) and high positive (>50 IU) (A and B, respectively). *Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$.

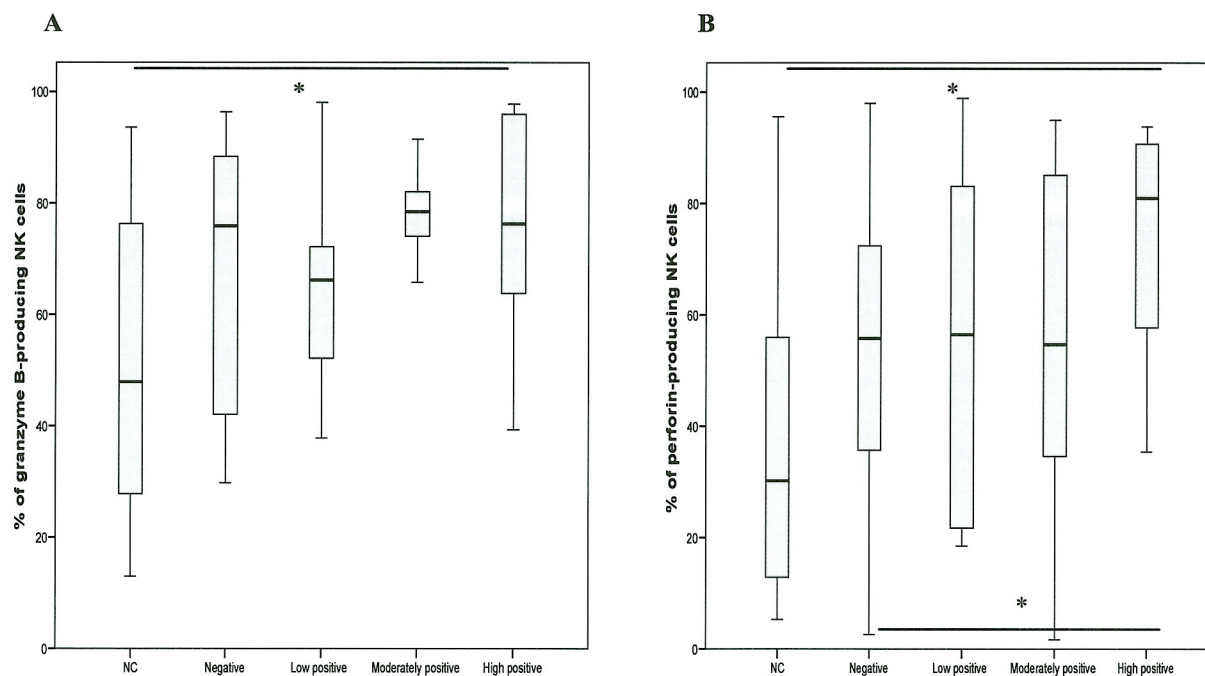


Figure 4. Frequency of peripheral blood CD56^{dim} NK cells producing granzyme B and perforin according to the expression levels of anti-dsDNA antibodies: negative, low positive (<20 IU), moderately positive (20-50 IU) and high positive (>50 IU) (A and B, respectively).

* Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$.

4. Discussão

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença auto-imune caracterizada pela presença de auto-anticorpos contra auto-antígenos, principalmente do núcleo celular, que se encontram expostos ao sistema imune devido a defeitos na eliminação de células apoptóticas, o que resulta na acumulação de complexos antígeno-anticorpo em vários órgãos, originando reacções inflamatórias. (1-4)

As células Natural Killer encontram-se envolvidas na regulação de determinadas doenças auto-imunes, como é o caso do LES, exercendo funções citotóxicas e de síntese e libertação de citocinas.

As células NK através das suas capacidades citotóxicas, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, via CD16 (um marcador específico para a fracção constante das imunoglobulinas), são capazes de reconhecer células com IgG ligados à membrana e induzir-lhes morte celular, através da libertação de perforinas e granzimas que activam a via das caspases induzindo a apoptose na célula alvo, o que leva à destruição de células e de tecidos; e através das suas capacidades imunoreguladoras, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ e o TNF- α , poderão agravar a situação inflamatória subjacente às doenças auto-imunes. (1,3,4,7,21)

Desta forma, o estudo da actividade das células NK pode ser importante para um melhor conhecimento da fisiopatologia e monitorização das doenças auto-imunes, como o LES.

No presente estudo verificou-se, tal como em estudos realizados anteriormente, que os doentes com LES apresentam uma diminuição da frequência e número absoluto de células NK no sangue periférico em relação aos indivíduos saudáveis, sendo esta mais notória nos pacientes que se encontram na fase activa da doença. Quanto às subpopulações de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim}, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos em estudo. (4,6,19,20,22,23)

Esta diminuição de células NK observada no sangue periférico dos doentes com LES pode dever-se a vários factores, como a diminuição dos precursores de células NK, a sua susceptibilidade à apoptose induzida por moléculas de sinalização como o CD16 (Fc γ RIIIa), assim como devido à influência de citocinas, como é o caso do IFN- α que pode mediar a

morte de células NK através da sua activação crónica que resulta em anergia e apoptose. Além disso, a diminuição das células NK no sangue periférico dos pacientes com LES pode dever-se à sua migração da corrente sanguínea para os locais de inflamação. (19,23)

Neste trabalho, também verificámos que os números de células NK, e dos seus subtipos, correlacionam-se com vários parâmetros de actividade do lúpus (como por exemplo, os títulos de anticorpos anti-dsDNA e o SLEDAI [Índice de actividade da doença LES]), observando-se uma correlação negativa entre os números absolutos de células NK CD56^{bright} e o SLEDAI, e uma tendência para uma correlação negativa significativa entre o SLEDAI e os números absolutos de células NK CD56^{dim}. Os números absolutos e relativos de célula NK e do subtipo CD56^{dim} correlacionam-se positivamente com a duração da doença, ao contrário das células NK CD56^{bright}. Também se verificou uma diminuição significativa do número absoluto de células NK CD56^{dim} e CD56^{bright} nos doentes com LES que apresentam anticorpos anti-dsDNA, comparativamente com os doentes com LES que não apresentam anticorpos anti-dsDNA.

Como já foi referido anteriormente, as células NK compreendem duas subpopulações, as CD56^{bright} e as CD56^{dim}, exibindo estas, diferente repertório, função e localização. Neste trabalho, verificámos que a expressão do antígeno CD57 é restrita às células NK CD56^{dim} (24,25), constituindo assim um marcador de citotoxicidade que nos permite diferenciar as duas subpopulações de células NK em estudo e definir um subconjunto de células altamente maduras que representam células de vida longa, representando assim as células NK de “memória”. Verificámos que existe uma menor frequência de células NK CD56^{dim} no sangue periférico dos doentes com LES a expressar CD57 em relação ao grupo controlo, o que se pode dever à migração destas células para os locais de inflamação. No entanto, não se observaram diferenças estatisticamente significativas quanto à expressão de CD57 por célula NK (MIF – média de intensidade de fluorescência de CD57) entre os três grupos em estudo.

Para avaliar a migração de células NK no LES, estudámos a expressão do receptor de quimiocina CXCR3, responsável pela migração celular para os tecidos inflamados, nos dois subtipos de células NK de doentes com LES e verificámos que estes doentes apresentam uma diminuição da frequência de células NK CD56^{dim}, no sangue periférico, a expressar CXCR3 relativamente ao grupo controlo, principalmente aqueles que se encontram na fase activa da

doença, o que pode dever-se à migração das células NK para os locais de inflamação, devido às elevadas concentrações dos ligandos do CXCR3 que circulam em ambientes inflamatórios como ocorre no LES, onde irão exercer as suas funções citotóxicas nos tecidos envolventes e consequentemente agravar a doença. A expressão de CXCR3 por célula também se encontra diminuída nos pacientes com doença activa em comparação com os pacientes com doença inactiva e com os indivíduos saudáveis. Esta menor expressão do receptor de quimiocina CXCR3 detectada na superfície das células NK dos doentes com LES, pode dever-se às elevadas concentrações dos seus ligandos, o CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que se verificam em estados inflamatórios, que faz com que se liguem ao seu receptor e não permitam a ligação do anticorpo monoclonal anti-CXCR3. De acordo com esta hipótese, foi verificado em estudos anteriores uma expressão aumentada de RNA mensageiro para IP-10 (CXCL10) em monócitos e subpopulações de células dendríticas CD14/baixo CD16+ nos doentes com LES activo. (26)

Observou-se uma correlação negativa entre a expressão de CXCR3 nos dois subtipos de células NK, assim como a frequência de células NK CD56^{dim} CXCR3+ e o SLEDAI. Estes resultados sugerem que a diminuição da expressão de CXCR3 nas células NK CD56^{dim} do sangue periférico dos pacientes com LES está relacionada com a actividade da doença e pode, portanto, representar um marcador de agravamento da doença. Assim sendo, uma terapêutica que bloqueie este receptor poderá ser benéfica para os doentes com LES. (11, 27)

As células NK através da produção de quimiocinas e citocinas podem influenciar o desenvolvimento ou o controlo das doenças auto-imunes. As citocinas podem agir como “peças-chave” na fisiopatologia do LES. Estas moléculas assumem um papel crítico na diferenciação, maturação e activação de células e também participam nos processos inflamatórios locais que medeiam as lesões dos tecidos no LES. (14,15)

As células NK quando activadas têm capacidade de produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas estudadas neste trabalho foram o IFN- γ e o TNF- α , e têm vindo a ser associadas à fisiopatologia do LES, uma vez que os doentes com LES apresentam grandes quantidades séricas destas citocinas.

No nosso estudo, determinámos a frequência de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} no sangue periférico dos doentes com LES a produzir IFN- γ e TNF- α , assim como, a

quantidade de citocina produzida por célula NK (MIF), e verificámos que relativamente à frequência de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} no sangue periférico a produzir IFN- γ , não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos saudáveis e os doentes com LES, quer na fase inactiva quer na fase activa da doença. No entanto, para a MIF de IFN- γ , verifica-se um aumento da produção desta citocina, tanto pelas células CD56^{bright} como pelas CD56^{dim}, nos doentes com LES em relação ao grupo controlo, contudo para as células CD56^{dim} as diferenças observadas entre os três grupos em estudo não foram estatisticamente significativas. Também se verificou uma correlação positiva entre a produção de IFN- γ pelas células NK CD56^{bright} e a duração da doença.

Tendo em conta o contexto da doença, o aumento da produção de IFN- γ pelas células NK CD56^{bright} nos doentes com LES, em relação ao grupo controlo, sugere que estas células se encontram activadas e reforça o seu importante papel nos processos inflamatórios e na fisiopatologia da doença. (28)

Relativamente ao TNF- α , verificou-se uma diminuição da frequência de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} no sangue periférico a produzir esta citocina, nos doentes com LES relativamente ao grupo controlo, sendo esta mais acentuada nos pacientes que apresentam a doença activa. Entre os dois grupos de doentes apenas se observam diferenças estatisticamente significativas para as células NK CD56^{bright} a produzir TNF- α . A diminuição da frequência de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} a produzir TNF- α no sangue periférico dos doentes com LES pode ser explicada pela migração destas células para os tecidos inflamados, tornando-se assim mais difícil detectá-las no sangue periférico.

Analisando a expressão de TNF- α nas células NK, verificamos que as células NK CD56^{dim} mostram uma maior capacidade para produzir esta citocina do que as células NK CD56^{bright}, e que esta expressão está significativamente reduzida nos pacientes com LES activo. Este resultado pode ser explicado, uma vez mais, pela migração destas células para os tecidos inflamados, bem como pela presença de alterações funcionais nas células NK ou pela activação crónica destas células.

As células NK quando activadas, sobretudo o subtipo CD56^{dim}, têm capacidade de produzir grânulos citoplasmáticos (perforinas e granzimas) responsáveis por induzir apoptose

nas células alvo, o que no caso particular do LES, pode levar a um aumento da destruição dos tecidos e à subsequente exposição de auto-antígenos e agravamento da doença.

No presente estudo, verificámos que apenas as células NK CD56^{dim} dos três grupos em estudo produzem granzima B e perforina. Observou-se um aumento da frequência de células NK CD56^{dim} a produzir granzima B e perforina no sangue periférico dos doentes com LES, principalmente naqueles que se encontram na fase activa da doença, comparativamente com o grupo controlo, verificando-se assim que as células NK CD56^{dim} do sangue periférico dos doentes com LES encontram-se activadas e a produzir grânulos citotóxicos, responsáveis pela morte celular, o que contribui para o processo inflamatório e manutenção da doença. Também verificámos que níveis elevados de anticorpos anti-dsDNA estão relacionados com uma maior frequência de células NK CD56^{dim} a expressar granzima B e perforina no sangue periférico, o que pode ser explicado pela activação das células NK CD56^{dim} via CD16 (receptor para a fracção constante das imunoglobulinas do tipo G) em função do aumento dos imunocomplexos circulantes.

Relativamente à MIF de granzima B verificou-se uma diminuição da quantidade de granzima B produzida pelas células NK CD56^{dim} do sangue periférico dos doentes com LES relativamente ao grupo controlo, principalmente no grupo com doença activa. Esta diminuição pode ser explicada por uma baixa sensibilidade das células NK CD56^{dim} ao ambiente inflamatório periférico, provavelmente devido a uma diferenciação deficiente ou defeitos na sua capacidade citolítica (28). Entre os dois grupos de doentes não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

Por outro lado, relativamente à análise da quantidade de perforina produzida por célula NK CD56^{dim} (MIF de perforina), verificou-se um aumento da produção de perforina por parte destas células nos doentes com LES, sobretudo naqueles que se encontram na fase activa da doença, em relação ao grupo controlo, no entanto sem significado estatístico. Entre os dois grupos de doentes em estudo não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

5. Conclusão

Em suma, podemos constatar que o número, actividade citotóxica, activação e tráfego das células NK encontram-se alterados no LES, estando estas alterações associadas à actividade da doença.

As células NK CD56^{bright} do sangue periférico dos doentes com LES activo produzem grandes quantidades de IFN- γ , o que pode contribuir para o estado inflamatório que estes doentes apresentam e para a fisiopatologia da doença.

Também as alterações na expressão de CXCR3 nas células NK circulantes no LES, particularmente em doença activa, que podem influenciar a capacidade de migração destas células, pode contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Estes resultados poderão contribuir para um melhor conhecimento acerca da contribuição das células NK na regulação recíproca entre a imunidade inata e adquirida no LES, e melhorar a nossa capacidade de monitorizar estas células como marcadores de actividade da doença e resposta ao tratamento e, talvez, proporcionar novas perspectivas de tratamento direccionado para células NK.

6. Referências bibliográficas

1. Schepis D, Gunnarsson I, Eloranta ML, Lampa J, Jacobson SH, Kärre K, Berg L: Increased proportion of CD56^{bright} natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009, 126:140-6.
2. Ringold S, Lynn C, Golub RM: Systemic lupus erythematosus. *JAMA* 2011, 306:668.
3. Mok CC, Lau CS: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003, 56:481-90.
4. Schleinitz N, Vély F, Harlé JR, Vivier E: Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2010, 131: 451-8.
5. Caligiuri MA: Human natural killer cells. *Blood* 2008, 112:461-9.
6. Lünemann A, Lünemann JD, Münz C: Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 2009, 15:352-8.
7. French AR, Yokoyama WM: Natural killer cells and autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 2004, 6:8-14.
8. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaeheri, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001, 97:3146-51.
9. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA: CD56^{bright} natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003, 101:3052-7.

10. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S: Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011, 331:44-9.
11. Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H: CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1173:310-7.
12. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechser M, Goodsaid F, Caligiuri MA: Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999, 162:4511-20.
13. Cooper MA, Colonna M, Yokoyama WM: Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Rep.* 2009, 10:1103-10.
14. Yap DY, Lai KN: Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *J Biomed Biotechnol* 2010, 2010:365083.
15. Avrănescu C, Biciușcă V, Dăianu T, Turculeanu A, Bălășoiu M, Popescu SN, Ionete O, Simionescu C: Cytokine panel and histopathological aspects in the systemic lupus erythematosus. *Rom J Morphol Embryol* 2010, 51:633-40.
16. Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N: Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol* 2008, 181:2211-9.
17. Postal M, Appenzeller S: The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2011, 56:537-43.

18. Aringer M, Smolen JS: The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2008, 10:202.
19. Park YW, Kee SJ, Cho YN, Lee EH, Lee HY, Kim EM, Shin MH, Park JJ, Kim TJ, Lee SS, Yoo DH, Kang HS: Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009, 60:1753-63.
20. Green MR, Kennell AS, Larche MJ, Seifert MH, Isenberg DA, Salaman MR: Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus erythematosus: demonstration of a killing defect in patients. *Clin Exp Immunol* 2005, 141:165-73.
21. Aktas E, Erten G, Kucuksezer UC, Deniz G: Natural Killer cells: versatile roles in autoimmune and infectious diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2009, 5: 405-420.
22. Erkeller-Yuksel FM, Lydyard PM, Isenberg DA: Lack of NK cells in lupus patients with renal involvement. *Lupus* 1997; 6(9):708-12.
23. Huang Z, Fu B, Zheng SG, Li X, Sun R, Tian Z, Wei H: Involvement of CD226+ NK cells in immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011; 186(6):3421-31.
24. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH: Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143(10):3183-91.
25. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 1983; 131(4):1789-96.
26. Carvalheiro T, Rodrigues A, Lopes A, *et al* (2012) Tolerogenic versus Inflammatory Activity of Peripheral Blood Monocytes and Dendritic Cells Subpopulations in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:934161.

27. Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P: Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. J Biol Chem 2003; 278(1):289-95.
28. Hervier B, Beziat V, Haroche J, *et al*: Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: excess interferon-gamma production in patients with active disease. Arthritis Rheum 2011; 63(6):1698-706.