



**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública**



**Instituto Politécnico  
de Coimbra**

## **ESTUDO FUNCIONAL E FENOTÍPICO DAS CÉLULAS NK EM ESCLEROSE SISTÉMICA**

**MAGDA VANESSA TEIXEIRA LEMOS**

**Coimbra**

**2013**



**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública**



## **ESTUDO FUNCIONAL E FENOTÍPICO DAS CÉLULAS NK EM ESCLEROSE SISTÉMICA**

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 de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Professor adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e co-orientação do Mestre Fernando José Figueiredo Agostinho d' Abreu Mendes, Especialista em ACSP Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra | Instituto Português do Sangue e da Transplantação na pessoa do Doutor Artur Paiva pelo apoio ao longo da realização deste trabalho, e por toda a orientação científica.

Agradeço ao Mestre Fernando Mendes pela preocupação, pelo apoio e por toda a ajuda mostrada na realização deste trabalho.

Agradeço ao Serviço de Reumatologia, à Dr<sup>a</sup>. Mariana Santiago, Dr<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> João e ao Professor Doutor José António Pereira da Silva.

Agradeço a toda a equipa da citometria de fluxo, em especial ao, sempre Mestre, Tiago Carvalheiro, pela paciência inesgotável, por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e ajuda e à Ana Lopes por todo o apoio científico, e pela preciosa ajuda na elaboração desta tese.

Agradeço à Mariana Raposo, Sara Horta e Cláudia Silva pela ajuda no trabalho laboratorial.

Agradeço aos meus amigos pelo carinho, à Andreia pela alegria e pelo espírito leve de uma amizade verdadeira, à Milene pelas mensagens, telefonemas e conversas encorajadores que se traduziam, muitas das vezes, em lágrimas, à Letícia pela partilha de angústias e por todo o apoio.

Agradeço, de forma especial, às minhas maiores âncoras, os meus pais. Obrigada por me darem o caminho para atingir os meus sonhos, por todo o amor, por serem um orgulho e um exemplo de vida.

Ao meu irmão, Miguel, pela alegria e, à avó Rosalina.

Ao Vasco por me apoiar e fazer parte de cada novo sonho e por me mostrar que tudo na vida tem mais encanto com amor.

## **Júri**

Doutor Armando José Cerejo Caseiro

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutor José Alberto Órfão de M. Correia e Vale

Professor Catedrático da Universidade de Salamanca

Doutor Artur Augusto Paiva

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Especialista em ACSP, Mestre Fernando José Figueiredo Agostinho d'Abreu  
Mendes

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

## Resumo

**Introdução:** A esclerose sistémica (ES) é uma doença reumática rara, onde se verifica uma reacção auto-imune, afectando o tecido conjuntivo. De etiologia desconhecida, esta patologia, divide-se em dois subtipos: limitada e difusa, tendo como processos característicos e inter-relacionados: a lesão vascular, a reacção autoimune e a fibrose. As células NK modulam as doenças auto-imunes através das suas capacidades citotóxicas e de produção de citocinas. Deste modo procedeu-se ao estudo imunofenotípico e funcional de duas subpopulações de células *Natural Killer* (NK) (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>).

**Métodos:** Recorrendo à citometria de fluxo, caracterizamos fenotipicamente as células NK, com base na expressão de CD49e, CD29 e LAIR-1; funcionalmente, com base nas citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e citotóxicamente, com base na granzima B e na perforina.

**Resultados:** Os nossos resultados sugerem uma diminuição da percentagem e valor absoluto de células NK totais e suas subpopulações, NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>, em doentes com ES, sobretudo na presença de úlceras digitais (UD) e fibrose pulmonar (FP). Observamos ainda uma diminuição da expressão de CD49e e um aumento da expressão de LAIR-1, nas células NK, em doentes com ES, principalmente nos que não apresentavam UD e FP. Num modo geral observou-se um aumento da frequência de células NK a expressar granzima B e perforina e um aumento da expressão destas duas proteínas.

**Conclusão:** Concluimos que as células NK poderão ter um papel importante na fisiopatologia da ES, pelas alterações fenotípicas e funcionais, podendo, futuramente vir a ser utilizados na monitorização da severidade desta doença.

## Palavras-chave

Esclerose Sistémica, células NK CD56<sup>dim</sup>, Células NK CD56<sup>bright</sup>.

## Abstract

**Introduction:** The systemic sclerosis cutaneous (SSc) is a rare rheumatic disease, in which occurs a self-immune reaction affecting the connective tissue. Although it has no known cause, this disease is characterized in two different sub-populations: the limited and the diffuse, both having the same inter-connected processes: vascular damage, self-immune reaction and fibrosis. The NK cells have an important role in self-immune diseases through their cytotoxic abilities and through the production of cytotoxins. The aim of this work is to study the immunophenotypical and functional characteristics of the sub-populations of NK cells (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) in SSc. **Methods:** Using flow cytometry the NK cells were characterized by phenotypes, according to their expression of CD49e, CD29 e LAIR-1; by functionality, according to their cytokines TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; and by cytotoxicity, according to their granzyme B and perforin. **Results:** Our results suggest a decrease in absolute value and percentage of total NK cells and their subpopulations, NK CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> NK in patients with SSc, particularly in the presence of digital ulcers and pulmonary fibrosis. We also observed a decreased expression of CD49e and an increased expression of LAIR-1, NK cells, in patients with SSc, especially without the above parameters. In general there was an increase of NK cells frequency expressing granzyme B and perforin and increased expression of these two proteins. **Conclusions:** We conclude that NK cells may have an important role in the pathophysiology of SSc, the functional and phenotypic changes, and may eventually come to be used in monitoring the severity of the disease.

## Keywords

Systemic Sclerosis, cells NK CD56<sup>dim</sup>, cells NK CD56<sup>bright</sup>

# Índice

---

Introdução.....	1
1. Esclerose Sistémica.....	2
1.1. Etiologia da Esclerose Sistémica.....	2
1.2. Classificação da Esclerose Sistémica .....	3
1.3. Fisiopatologia da Esclerose Sistémica .....	4
1.3.1. Disfunção Vascular .....	6
1.3.2. Resposta Imune Anormal / Inflamação crónica.....	7
1.3.3. Fibrose.....	9
1.4. Terapêutica da Esclerose Sistémica .....	10
2. Função anormal de células Natural Killer em Esclerose Sistémica, produção de citocinas e alterações ao nível da morte celular .....	11
2.1.1. Células <i>Natural Killer</i> .....	11
2.2. Caracterização das Células <i>Natural Killer</i> .....	12
2.2.1. Subtipos de Células <i>Natural Killer</i> .....	13
2.2.2. Função citotóxica – Perforina e Granzima B.....	14
2.2.3. Citocinas - IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ .....	15
2.2.4. Moléculas de adesão – CD49e, CD29 e LAIR-1 .....	15
2.2.4.1. CD49e (integrina $\alpha_5$ ) .....	16
2.2.4.2. CD29 (integrina $\beta_1$ ) .....	17
2.2.4.3. ....Receptor da imunoglobulina do tipo I associado aos leucócitos - LAIR-1	17
Objectivos .....	19
Materiais e Métodos .....	21
1. Grupos de estudo .....	22
2.1. Caracterização fenotípica das células Natural Killer CD56 <sup>dim</sup> e Natural killer CD56 <sup>bright</sup> .....	23
2.2. Caracterização funcional/citotóxica das células Natural Killer CD56 <sup>dim</sup> e Natural Killer CD56 <sup>bright</sup> no sangue periférico. ....	24
2.3. Estimulação <i>in vitro</i> das células <i>Natural Killer</i> .....	24
2.4. Caracterização funcional das células <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>dim</sup> e <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>bright</sup> no sangue periférico.....	25
3. Citometria de fluxo e análise dos resultados .....	25
4. Análise Estatística.....	26

Resultados:.....	27
1. Quantificação de células <i>Natural Killer</i> e suas subpopulações, <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>dim</sup> e <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>bright</sup> , no sangue periférico .....	28
1.1. Percentagem e valor absoluto das células <i>Natural Killer</i> totais e das duas subpopulações, <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>dim</sup> e <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>bright</sup> no sangue periférico, de acordo com o subtipo, presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais	28
1.2. Caracterização fenotípica e funcional das duas subpopulações de células <i>Natural Killer</i> , <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>dim</sup> e <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>bright</sup> , nos dois subtipos de Esclerose Sistêmica, difusa e limitada. ....	29
1.3. Caracterização fenotípica e funcional das duas subpopulações de células <i>Natural Killer</i> , <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>dim</sup> e <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>bright</sup> , em doentes com Esclerose Sistêmica na presença ou ausência de Úlcera Digital. ....	32
1.4. Caracterização fenotípica e funcional das duas subpopulações de células <i>Natural Killer</i> , <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>dim</sup> e <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>bright</sup> , em doentes com Esclerose Sistêmica na presença ou ausência de Fibrose Pulmonar. ....	34
1.5. Caracterização fenotípica e funcional das duas subpopulações de células <i>Natural Killer</i> , <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>dim</sup> e <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>bright</sup> , em doentes com Esclerose Sistêmica de acordo com a duração da doença.....	36
1.6. Ratio entre as duas integrinas CD29/CD49e nas duas subpopulações de células <i>Natural Killer</i> , <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>dim</sup> e <i>Natural Killer</i> CD56 <sup>bright</sup> , em doentes com Esclerose Sistêmica difusa e limitada. ....	43
Discussão dos Resultados .....	45
Conclusão.....	52
Referências Bibliográficas.....	54



## *Índice de Figuras*

---

Figura 1 – Expressão da Moléculas de Adesão (CD49e) nas 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) ao longo da doença. ....	36
Figura 2 – Expressão da Moléculas de Adesão (LAIR-1) nas 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) ao longo da doença. ....	37
Figura 3 – Expressão da Moléculas de Adesão (CD29) nas 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) ao longo da doença... ..	38
Figura 4 – Expressão de CD29 nas 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> )..	38
Figura 5 - Expressão de perforina nas 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) ao longo da doença.....	39
Figura 6 – Frequência das 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) a expressar perforina.....	39
Figura 7 - Expressão de granzima B nas 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ).....	40
Figura 8 – Frequência das 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) a expressar granzima B.....	40
Figura 9 – Expressão de IFN- $\gamma$ nas 2 subpopulações de células NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ).....	41
Figura 10 - Frequência das 2 subpopulações NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) a expressar IFN- $\gamma$ .....	41
Figura 11 - Expressão de TNF- $\alpha$ nas 2 subpopulações de células NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ).....	42

Figura 12 - Frequência das 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) a expressar TNF- $\alpha$ .....42

Figura 13 – Ratio de CD29/CD49e nas 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>).....43

## *Índice de Tabelas*

---

Tabela I - Características clínicas dos doentes com ES. ....	22
Tabela II - Percentagem (%) e Valor Absoluto (V.A.; cel/ $\mu$ l) das células NK totais e das suas 2 subpopulações, NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> , em Esclerose Sistémica Difusa (ESD), e em Esclerose Sistémica Limitada (ESL) e no grupo controlo. Dos doentes com Esclerose Sistémica foram analisados parâmetros clínicos de severidade da doença como episódios de Úlcera Digital, Fibrose Pulmonar e o tempo de duração da doença. .	29
Tabela III – Frequência das 2 subpopulações de células NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) a expressar moléculas de adesão (CD49e e LAIR-1), perforina, granzima B, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e expressão de cada um dos parâmetros nas 2 subpopulações de células NK. em doentes com Esclerose Sistémica Difusa (ESD), em Esclerose Sistémica Limitada (ESL) e no grupo controlo.....	31
Tabela IV - Frequência das 2 subpopulações de células NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) a expressar moléculas de adesão (CD49e e LAIR-1), perforina, granzima B, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e expressão de cada um dos parâmetros nas 2 subpopulações de células NK em doentes com Esclerose Sistémica na presença e ausência de Úlcera Digital. ....	33
Tabela V – Frequência das duas subpopulações de células NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) a expressar moléculas de adesão (CD49e e LAIR-1), perforina, granzima B, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e expressão de cada um dos parâmetros nas 2 subpopulações de células NK em doentes com Esclerose Sistémica na presença e ausência de Fibrose Pulmonar. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF) e em Percentagem (%). ....	35

## Abreviaturas

---

ANA	<i>Anti-Nuclear Antibody</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
APC-cy7	Aloficocianina 7
AR	Artrite reumatóide
ATA	Anti-DNA topoisomerase I
CAMs	<i>Cell adhesion molecules</i>
CD29	Integrina $\beta$ 1
CD49e	Integrina $\alpha$ 5
CE	Células endoteliais
Células NK	Células <i>Natural killer</i>
Células NK CD56 <sup>bright</sup>	Células NK CD56 <sup>++</sup>
Células NK CD56 <sup>dim</sup>	Células NK CD56 <sup>+</sup>
CXCL4	CHC <i>chemokine ligand-4</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ES	Esclerose Sistémica
ESD	Esclerose Sistémica Difusa
ESL	Esclerose Sistémica Limitada
ET-1	<i>Endothelin-1</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor-2</i>
FITC	Fluoresceína de Isotiocionato
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
ICAM-1	<i>Intercell adhesion molecule-1</i>
IFN- $\gamma$	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
Ig	Imunoglobulina
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif</i>
LAIR-1	CD305
LES	Lúpus Eritematoso Sistémico
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	Intensidade Média de Fluorescência
min	Minutos
MIP-1 $\alpha$	<i>Macrophage inflammatory protein-1<math>\alpha</math></i>
mRSS	<i>modified Rodnan Skin Score</i>
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PC5	Ficoeritina Cianina
PC7	Ficoeritina Cianina 7
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	Ficoeritina
PerCP cy 5.5	Proteína Piridina – Clorofila Cianina 5.5

PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
Rpmi-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SI	Sistema immune
SP	Sangue periférico
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSC	<i>Side-scattered light</i>
TA	Temperatura ambiente
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TLS	Tecido linfóide secundário
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLA5	Integrina $\alpha 5\beta 1$









## *Introdução*

---

## **1. Esclerose Sistémica**

A esclerose sistémica (ES) é uma doença reumática rara, onde se verifica uma reacção auto-imune, que afecta o tecido conjuntivo.(1)

Esta patologia é caracterizada por alterações da microvasculatura, alterações da imunidade celular e humoral, culminando num processo grave e progressivo de fibrose causado por uma deposição excessiva de colagénio e outros componentes da matriz extracelular.(2)

As lesões que ocorrem frequentemente nesta patologia incluem lesão epidérmica, calcinose, Fenómeno de Raynaud, úlceras cutâneas (as manifestações cutâneas mais comuns da ES) e telangiectasias.(3, 4)

Esta patologia auto-imune desenvolve-se como um distúrbio heterogéneo, com diferentes características clínicas. Além do envolvimento da pele ocorrem lesões ao nível multiorgânico em órgãos como pulmões, rins, coração e sistema gastrointestinal, podendo culminar numa deficiência funcional completa.(5)

Os sintomas clínicos que os doentes com ES manifestam incluem vasoconstrição periférica e persistente, inchaço e contratura dos dedos, endurecimento da pele, poliartralgia e disfagia.(3)

A morbidade e mortalidade da ES são elevadas, dentro das doenças reumáticas e relacionadas com a extensão da fibrose e das alterações microvasculares. Deste modo a fibrose da pele, correlaciona-se com a sobrevivência e limitações funcionais.(1)

### **1.1. Etiologia da Esclerose Sistémica**

Apesar de ser uma doença de etiologia desconhecida pensa-se que a origem da ES esteja relacionada com interações complexas entre um ou mais factores ambientais e uma predisposição genética do doente.(1)

Os factores genéticos não podem ser excluídos, no entanto, a influência do ambiente parece ser mais importante. Notavelmente, a exposição crónica a substâncias químicas, a infecção viral por citomegalovírus, a infecção por um membro da família de vírus do herpes, e o microquimerismo, revelam um papel importante nesta patologia.(6)

As interacções genético-ambientais resultam num desenvolvimento de fibrose de tecidos acompanhada de uma grave fibroproliferação/vasculopatia oclusiva, anomalias da imunidade humoral e celular com ocorrência de infiltração de células inflamatórias de forma crónica, perturbação do equilíbrio de citocinas e de factores de crescimento e desenvolvimento de inúmeros auto-anticorpos.(1)

Esta patologia tem maior incidência em pessoas com idades compreendidas entre os 45 e os 55 anos sendo que o sexo feminino é três a oito vezes mais afectado que o sexo masculino.(7)

## **1.2. Classificação da Esclerose Sistémica**

Os doentes com ES são geralmente classificados em dois subtipos clínicos principais, de acordo com a extensão e o padrão de envolvimento da pele: ES limitada (ESL) e ES difusa (ESD) sendo associados a diferentes complicações e prognósticos clínicos.(8)

Os doentes com ESL apresentam esclerose da pele circunscrita às mãos, pés e antebraços. Nestes doentes o Fenómeno de Raynaud surge anos antes da doença ser diagnosticada. Estes doentes tendem a apresentar, numa fase posterior, hipertensão pulmonar, neuralgia trigeminal, calcinose e teleangiectasias estando-lhe associado, geralmente, um bom prognóstico.(2)

Nos doentes com ESD o Fenómeno de Raynaud surge um ano antes do envolvimento da pele. Este subtipo da doença caracteriza-se por um espessamento da pele das áreas próximas dos joelhos, cotovelos, tórax e abdómen. Nestes doentes ocorre também fibrose de órgãos internos, o que pode levar à falha dos mesmos. Os doentes com este tipo de ES apresentam precocemente doença intersticial pulmonar, insuficiência renal, oligúrica, doença gastrointestinal difusa e envolvimento do miocárdio estando-lhe associado, também, um mau prognóstico.(2)

O prognóstico da ESL é melhor que o da ESD, excepto para os doentes que após muitos anos, com esta patologia, desenvolvem hipertensão arterial pulmonar ou cirrose biliar.(9-11)

Uma outra evidência da ES é a presença de auto-anticorpos que estão correlacionados com a extensão do envolvimento da pele e com várias manifestações clínicas como fibrose pulmonar e crise renal. Os anticorpos mais comuns são o anti-DNA topoisomerase I (ATA) e o anti-centrómero. Qualquer um destes anticorpos é marcador específico de cada subtipo de ES, sendo o anticorpo anti-centrómero tipicamente associado à ESL, enquanto que, o ATA à ESD.(1)

Certas características clínicas da ES e a presença de auto-anticorpos específicos variam em diferentes países e etnias. Este facto evidencia que os factores genéticos podem influenciar as diferentes características clínicas dos subgrupos da doença e os auto-anticorpos presentes.(8)

A intensidade e a extensão do espessamento cutâneo são avaliadas através da palpação da pele utilizando o *score* de Rodnan modificado (mRSS do inglês *modified*

*Rodnan skin score*). Este sistema de *scoring* avalia dezassete áreas anatómicas através da palpação com avaliação da espessura da pele numa escala de zero a três (zero = normal, um = espessamento leve, dois = espessamento moderado e três = espessamento grave). (10) As dezassete áreas da superfície corporal compreendem o rosto, peito, abdómen, mãos, braços, pernas e pés). A pontuação total (a soma das pontuações das dezassete áreas da superfície corporal) é considerada, sendo que uma pontuação superior a vinte está associada a um mau prognóstico. Este método verifica-se viável, confiável, válido e sensível sendo utilizado na rotina clínica no estudo de doentes com ES.(12)

### **1.3. Fisiopatologia da Esclerose Sistémica**

A fisiopatologia envolve várias linhas celulares, bem como o endotélio, fibroblastos, linfócitos e os seus respetivos mediadores solúveis. Estas células vão determinar a fase inicial vascular com infiltrado inflamatório e posteriormente a fibrose. A fase vascular inicia-se no endotélio dos pequenos vasos do organismo, embora se desconheça o evento primário que desencadeia o dano endotelial.(13)

O óxido nítrico, as prostaciclina e o sistema de endotelinas regulam o tónus vascular do organismo. Tanto o óxido nítrico como as prostaciclina são potentes vasodilatadores endógenos que também têm acção anti-proliferativa. Por outro lado, o sistema de endotelinas actua equilibrando o tónus vascular, sendo um potente vasoconstritor. As células endoteliais participam, também, na homeostase vascular regulando tanto o tónus muscular como a proliferação celular.(13)

A anormal vasoconstrição que ocorre nesta patologia é causada pelo desequilíbrio de mediadores acima supracitados. A hipóxia tecidual é um dos fenómenos primários que modificam o tónus vascular. A inflamação celular, os infiltrados perivasculares com deposição de complemento e a libertação de mediadores pró-inflamatórios completam o quadro da ES.(13)

O curso e até mesmo os eventos iniciais da ES estão, ainda, pouco compreendidos. A microvasculatura (células endoteliais, plaquetas e capilares) é um dos primeiros sistemas afectados, precedendo, por vezes, o surto da doença (fenómeno de Raynaud). Há evidências de que a doença pode ser desencadeada imunologicamente, de novo como um evento precoce. Os linfócitos T, em colaboração com os monócitos, células endoteliais, plaquetas e mastócitos actua como mediadores e alvos na rede fisiopatológica. Estas células expressam e libertam moléculas de adesão, interleucinas e factores de crescimento que actua sobre os fibroblastos. No entanto, a fibrose tecidual

excessiva é devida à expansão dos clones fibrogénicos dos tecidos, que se comportam de forma relativamente autónoma e devido aos genes que codificam e sub-expressam componentes da matriz extracelular. Todas estas ocorrências levam à deposição excessiva de colagénio e outras proteínas da matriz do tecido conjuntivo na pele, nos órgãos internos e nas paredes dos vasos sanguíneos.(2)

Pensa-se que a ES se inicia por vasculopatias através da morte massiva das células endoteliais que levam à obliteração das pequenas artérias e arteríolas. No entanto, é pouco claro se os auto-anticorpos, característicos da patologia, são produzidos antes do danos vascular e/ou em resposta a esta ocorrência. Subsequentemente, as comunicações célula-a-célula são substancialmente alteradas, devido sobretudo às citocinas e à secreção desregulada de factores de crescimento. A consequência destas alterações biológicas, nos tecidos e órgãos, é uma deposição excessiva de colagénio e outros componentes da matriz extracelular, ocorrência de fibrose, seguida de perda de função.(6)

Uma das hipóteses do surgimento desta patologia apoia-se em vários estudos que evidenciam uma associação entre o desenvolvimento da ES em mulheres após a gravidez, e a detecção de células fetais no sangue periférico das mesmas. Este evento, conhecido como microquimerismo, ocorre quando as células do feto entram na circulação materna e persistem, na progenitora, durante várias décadas após o parto. (14, 15)

Esta hipótese também prevê que as células maternas passem para o feto, causando-lhe patologias. Estes pressupostos explicariam a prevalência superior em mulheres já com filhos, mas também explicariam a existência da doença em homens. A consequência desta transferência imunológica ainda não é bem entendida, mas é possível que possa ter um papel importante nas doenças auto-imunes. Estudos sugerem, ainda, que estas células são activadas por um estímulo ambiental, desenvolvendo reacções que podem levar a sintomas clínicos característicos da ES.(14, 15)

A ES possui, assim, três características patogénicas responsáveis pelas manifestações que nela ocorrem: disfunção vascular, desregulação do sistema imune, que leva à inflamação crónica e à activação dos fibroblastos, resultando numa fibrose tecidual generalizada com uma deposição excessiva de colagénio e outros componentes da matriz extracelular.

### 1.3.1. Disfunção Vascular

Das três características patogénicas da ES, a vasculopatia, ou disfunção vascular, julga-se que é a primeira a ocorrer. Esta não é necessariamente um processo inflamatório mas sim um processo sistémico.(16, 17)

A mais proeminente disfunção vascular na ES está relacionada com a desregulação do tónus vascular que leva ao espasmo e à diminuição do fluxo sanguíneo, acontecimento designado por fenómeno de Raynaud.(16, 17)

O fenómeno de Raynaud ocorre devido a uma oclusão arterial após exposição ao frio ou ao *stress*. Na ES, o desequilíbrio nos sinais endoteliais, a deficiência de mecanismos vasodilatadores, o aumento da agregação plaquetária e o défice de neuropeptídeos conduz à propensão da vasopasticidade da doença. Existem outros factores tóxicos que contribuem para este fenómeno como é o caso das proteases, granzimas, dos lipoperóxidos, da imunoglobulina (Ig) IgG e de anticorpos anti-endoteliais. Este fenómeno vasopástico ocorre nos dedos das mãos, pés e, menos frequentemente, no nariz, orelhas e mamilos. É possível observar-se, este fenómeno, em cerca de 90-98% dos doentes com ES. A sua ocorrência pode preceder a doença e a sua presença pode ter valor preditivo para o desenvolvimento posterior da ES, em particular quando há associação deste fenómeno com alterações capilares e com o aparecimento de anticorpos anti-nucleares (ANA do inglês *anti-nuclear antibodies*). (2, 9)

Estudos sugerem que as moléculas de adesão celular desempenham um papel importante na vasculopatia da ES estando os seus níveis séricos aumentados nesta patologia. Os níveis séricos da E-selectina, da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1 do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*) e a molécula de adesão intercelular-1 solúvel (ICAM-1 do inglês *intercellular adhesion molecule-1*), correlacionam-se com a gravidade da doença.(18)

O aumento da expressão de moléculas de adesão específicas pode levar a uma acumulação aumentada de linfócitos na pele segundo Abraham *et al*. Verificou-se que nos doentes com ES os fibroblastos têm uma maior propensão para a ligação de linfócitos T comparado com fibroblastos normais, em parte, pela sua sobre-expressão de ICAM-1. A sobre-expressão de moléculas de adesão resulta na acumulação de linfócitos activados específicos, que podem desempenhar um papel importante na indução de fibrose por libertação de citocinas que conduzem à síntese de componentes da matriz extracelular.(18)

No entanto, o evento que inicia lesão vascular em doentes com ES é actualmente desconhecido. Agentes infecciosos, células T citotóxicas, o óxido nítrico, e auto-anticorpos contra as células endoteliais foram implicados na disfunção da célula endotelial.(17)

A perda notável de capilares e pequenos vasos em doentes com ES sugere um defeito nos processos de angiogénese e vasculogénese, apesar do nível plasmático do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF do inglês *vascular endothelial growth factor*) se apresentar elevado na ES. Os níveis plasmáticos de outros factores pró-angiogénicos como é o exemplo do factor de crescimento de plaquetas (PDGF do inglês *platelet-derived growth factor*), e do factor de crescimento de fibroblastos (FGF-2 do inglês *fibroblast growth factor-2*), estão, também, consideravelmente elevados no plasma de doentes com ES. Este aumento resulta de um efeito na rede de citocinas, tais como interleucina-1 (IL-1) ou pela hipóxia causada pela oclusão de vasos. Níveis elevados de factores anti-angiogénicos, tais como a angiostatina, o factor 4 das plaquetas (CXCL4 do inglês *CHC chemokine ligand-4*), trombospondina-1, e IL-4 foram também observados, anulando o efeito dos factores pró-angiogénicos. No entanto, continua por esclarecer estes níveis desregulados em circulação e de que forma, estes, contribuem para a vasculopatia.(17)

Outro facto importante, na ES, é a evidência da indução da apoptose, que ocorre nas células endoteliais, originada pelo mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, sendo este processo iniciado pelas células NK do inglês *Natural Killer*.(16)

### **1.3.2. Resposta Imune Anormal / Inflamação crónica**

A activação imune é um evento precoce na ES. No entanto, não se sabe se é o evento inicial ou se é secundário a outros processos da doença.(19)

De facto como a ES é uma doença auto-imune, envolve uma resposta imune anormal. A presença de auto-anticorpos específicos é evidente no soro de 90% dos doentes com ES, segundo Castro e Jimenez. Anticorpos como o 70-anti-Scl (anticorpos dirigidos contra topoisomerase-I) e anticorpos anti-centrómero, são utilizados como biomarcadores de diagnóstico para apoiar ou confirmar o diagnóstico clínico de ES. Nesta patologia são também comuns anticorpos anti-RNA polymerase I e III e anticorpos anti-PM-Scl.(1, 19)

Algumas das evidências, fornecidas pela demonstração de infiltrados de células T, macrófagos, mastócitos e linfócitos B na pele afectada de doentes com a doença,

sugerem que a inflamação crónica e persistente pode desempenhar um papel crucial na patogénese da ES.(1)

Na ES existe uma inflamação crónica, ou seja, o problema surge quando não há um equilíbrio entre os sistemas pró e anti-inflamatórios. Na inflamação crónica não ocorre resolução da inflamação, permanecendo os mecanismos pró-inflamatórios e as células do sistema imune constantemente activados. As doenças auto-imunes tais como a artrite reumatóide (AR) e o lúpus eritematoso sistémico (LES) são exemplos de patologias com inflamação crónica e constituem um dos grandes mistérios da imunologia. Assim, uma inflamação crónica caracteriza-se por uma falha do sistema anti-inflamatório endógeno o que leva à persistência da inflamação e de alguma forma está ligado à auto-imunidade.(20)

Geralmente a inflamação pode aparecer na pele antes de qualquer evidência histológica de fibrose. Progressivamente, e à medida que aumenta a fibrose, o infiltrado inflamatório tende a diminuir. As células mononucleares presentes no infiltrado são predominantemente células T CD4 e macrófagos. As células NK estão, também, presentes mas em número reduzido como acontece com as células T  $\gamma\delta$ . Os dados disponíveis sobre as características das células T são heterogéneos. A maioria dos dados apoia um papel patogénico destas células, levando à fibrose dos tecidos, evidenciado através da IL-4, uma citocina específica das células Th2.(21)

A IL-4 e o factor de crescimento transformante-  $\beta$  (TGF- $\beta$  do inglês *transforming growth factor beta*) são as principais citocinas fibrogénicas na ES. A IL-4 aumenta a produção de colagénio pelos fibroblastos de doentes com ES e induz a produção de TGF- $\beta$ . Por sua vez, o TGF- $\beta$  estimula a síntese de colagénio, proteoglicanos e fibronectina, e inibe a degradação da matriz extracelular por diminuir a síntese de metaloproteinases de matriz através do aumento da síntese do seu inibidor tecidual.(21)

A maioria dos autores consideram que as células Th2 estimulam a síntese de colagénio e a produção de células Th1, produtoras de interferon *interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ), inibe a síntese de colagénio. No entanto, algumas evidências mostram que as células Th2 podem reduzir a síntese de colagénio do tipo I por fibroblastos dérmicos e que uma percentagem aumentada de células T periféricas produtoras de IFN- $\gamma$  pode ser observada em doentes com ES. Portanto, é possível que citocinas Th1, além de citocinas Th2, também possam desempenhar um papel importante no desenvolvimento de ES. Outras citocinas encontram-se em níveis aumentados no soro e nos tecidos dos doentes com ES tais como a IL-1, IL-6 e o factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF do inglês *connective tissue growth factor*). Todos estes mediadores estão implicados na



patogénese da ES e afectam os fibroblastos, as células endoteliais e macrófagos. As Células T podem, ainda, induzir fibrose através de citocinas ou através do contato direto com fibroblastos.(15)

### 1.3.3. Fibrose

A fibrose é a fase final de ES que ocorre devido à deposição de colagénio na derme superior com perda de estruturas anexiais e tecido adiposo associado. Os factores de iniciação, para o processo, ocorrem devido a uma lesão vascular e disfunção imune resultantes de uma resposta inflamatória desregulada.(16, 22)

Embora o TGF- $\beta$  não esteja aumentado no soro de doentes com ES, vários estudos implicaram essa citocina como um factor estimulador para a ocorrência de fibrose nos órgãos envolvidos.(23)

A fibrose associada à ES tem incidido sobre o papel dos fibroblastos e miofibroblastos, que são as células efectoras que estão, em última análise, envolvidos na produção de colagénio e de proteínas da matriz extracelular. No entanto, o desenvolvimento de fibrose na ES é, de facto, um processo complexo que envolve vários tipos de células, incluindo as células epiteliais, endoteliais, imunológicas, e mesenquimais.(24)

O processo fibrótico é mais proeminente na pele, pulmões, tracto gastrointestinal, coração, tendões e ligamentos. A fibrose é secundária à deposição de componentes da matriz extracelular, causada pelo excesso de produção de colagénio e de outras glicoproteínas como é o caso da fibronectina e da fibrilina.(24)

O componente da matriz extracelular mais abundante no processo fibrótico é o colagénio tipo I. A substituição progressiva da arquitectura do tecido normal por colagénio leva à disfunção dos órgãos. A acumulação excessiva de tecido conjuntivo resulta da produção excessiva de fibroblastos e outras células mesenquimais activadas por diversos mediadores solúveis.(24)

Os mecanismos fibrogénicos, que originam fibrose tecidual na ES, são complexos e, provavelmente, causados por mais que um factor de crescimento/citocina ou mediador. A produção de citocinas, factores de crescimento e quimiocinas que induzem a fibrose são produzidos pelas células T, células B, monócitos, células NK e mastócitos que se encontram acumuladas no infiltrado.(24)

O factor de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$  do inglês *transforming growth factor  $\beta$* ) é um mediador crítico de fibrose. Esta citocina afecta a proliferação e diferenciação celular, a apoptose e uma grande variedade de funções homeostáticas. É

importante notar que o TGF-  $\beta$  é considerado como o "interruptor principal" da fibrose em muitos tecidos, incluindo o pulmão. Os efeitos principais do TGF-  $\beta$  incluem a inibição da proliferação de células epiteliais, a indução da proliferação de fibroblastos e a expressão de genes que codificam os componentes da matriz extracelular e a inibição da expressão de genes de metaloproteinases. O TGF-  $\beta$  pode estimular a conversão de fibroblastos em miofibroblastos contrácteis, que produzem activamente o colagénio e outras proteínas da matriz extracelular levando à fibrose.(24)

Pensa-se que as células pró-fibróticas, como é o caso dos fibroblastos, são mais resistentes à apoptose, apesar do sistema imunitário se esforçar em removê-las. Algumas evidências indicam que a apoptose das células epiteliais pode desempenhar um papel importante na fibrose. A morte das células epiteliais é claramente mediada através do complexo Fas/FasL. As células T activadas e os fibroblastos podem expressar FasL e induzir a apoptose. Durante os ciclos repetitivos da lesão epitelial, as células lesadas libertam citocinas e factores de crescimento, que promovem a activação dos fibroblastos, tais como no processo de cicatrização de feridas. Esses fenómenos crónicos levam à fibrose. No entanto, existem também outras vias apoptóticas. É conhecida, ainda, a participação de grânulos citolíticos, como a perforina e a granzima, secretados por células NK ou linfócitos T citotóxicos.(6)

#### **1.4. Terapêutica da Esclerose Sistémica**

A ES é uma patologia que ainda não tem cura, sendo que o tratamento que se pode oferecer aos doentes é sobretudo dirigido aos sintomas. A terapia farmacológica pode ser dividida em estratégias imunossupressoras, vasculares e anti-fibróticas.(2)

O tratamento sintomático ajuda a melhorar a qualidade de vida. Os agentes modificadores da doença vão tratar as três vias diferentes da patogénese da doença, tais como a doença vascular, autoimunidade e fibrose do tecido. A escassez de critérios objetivos torna a avaliação de melhoria ou deterioração mais difícil. O recurso a fisioterapia, para maximizar a amplitude de movimento de todas as grandes articulações, e o aconselhamento psicológico são componentes necessários de uma boa gestão da ES.(2)

Os tratamentos actuais, para os efeitos da ES como é o caso do fenómeno de Raynaud e das úlceras digitais (UD), consistem em vasodilatadores, incluindo os bloqueadores de canais de cálcio, alfa-adrenérgicos, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor da angiotensina, e análogos de nitroglicerina. Estes medicamentos são moderadamente eficazes, reduzindo, assim, a

gravidade dos sintomas, mas normalmente não conduzem a vantagens substanciais em termos de cura e prevenção.(25)

Com a disponibilidade de terapias vasodilatadoras potentes para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar, as opções para o tratamento do fenómeno de Raynaud grave, UD e isquémia digital, aumentaram progressivamente. Análogos da prostaciclina têm sido utilizados para acelerar a cicatrização de UD, evidenciando um tratamento eficaz, no entanto requerem a administração intravenosa ou subcutânea. Alguns estudos têm indicado que inibidores da fosfodiesterase-5 são eficazes na redução da gravidade do fenómeno de Raynaud e na cicatrização de UD. O tratamento do fenómeno de Raynaud e das UD pode ainda ser efectuado pela administração do vasoconstritor da endotelina-1 (ET-1 do inglês *endothelin-1*). (25)

Têm surgido novas abordagens terapêuticas como é o caso da depleção de células B com Rituximab, surgindo como uma terapia promissora para uma ampla gama de doenças auto-imunes sistémicas.(26)

Terapias como o transplante autólogo de células estaminais, têm sido aplicadas no tratamento desta patologia.(15)

## **2. Função anormal de células *Natural Killer* em Esclerose Sistémica, produção de citocinas e alterações ao nível da morte celular**

### **2.1.1. Células *Natural Killer***

As células NK são caracterizadas pela sua capacidade de lisar células transformadas ou infectadas por vírus sem sensibilização prévia de antigénio, contribuindo assim para a defesa do hospedeiro no início da imunidade inata.(27)

As células NK são reconhecidas pelos seus efeitos citotóxicos e de regulação, implicadas na prevenção da auto-imunidade. Por exemplo, a frequência de células NK no sangue periférico é menor em doentes com LES quando comparados com indivíduos saudáveis.(27)

Nos últimos anos, outras funções das células NK foram identificadas, particularmente a sua capacidade para produzir várias citocinas. As células NK não produzem apenas citocinas do tipo Th1 como é o caso do *Interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ), o factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  do inglês *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), o factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*), mas também as citocinas Th2, como a IL-5, IL-10 e a IL-13 e também o TGF- $\beta$ . Assim, as células NK são capazes de regular as respostas imunes, quer directamente quer indirectamente, através de secreção de citocinas. De facto a evidência que as células NK

estão envolvidas em patologias auto-imunes é explícita. Por sua vez, na ES foram observadas anomalias destas células, embora com resultados contraditórios.(27)

## 2.2. Caracterização das Células *Natural Killer*

As células NK são linfócitos grandes granulares que pertencem ao sistema imunitário inato que “matam” sem exposição prévia e sensibilização de antígenos através de libertação de granzima, perforina, TRAIL (do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), e FasL.(28)

As células NK são reguladas através de interações dos receptores com ligandos de superfície expressos nas células, como acontece com as células infectadas por vírus ou células transformadas.(28)

As células NK têm uma multiplicidade de receptores de activação e de inibição que ligam moléculas do complexo de major histocompatibilidade (MHC *Major histocompatibility complex*) de classe I, moléculas-*like* MHC de classe I, e moléculas não relacionadas com MHC.(29)

Para além do seu efeito citolítico, as células NK podem também regular as células dendríticas, macrófagos e neutrófilos. A capacidade que as células NK têm para distinguir, entre potenciais, células alvo e células saudáveis é regulada por uma integração de sinais derivados a partir de um repertório complexo de receptores de activação e inibição.(30)

O fenótipo de superfície da célula NK define-se tradicionalmente pela ausência de CD3 e pela expressão de CD56 e de CD2.(31)

As células NK podem secretar citocinas e quimiocinas que influenciam a resposta imune do hospedeiro, e/ou matar as células infectadas ou transformadas via perforina/granzima ou via receptor de morte (Fas, TRAIL). O IFN- $\gamma$  é considerado a citocina de células NK prototípica, e sua produção por estas células é conhecida por moldar a resposta imune do tipo Th1. Assim, o IFN- $\gamma$  está envolvido na activação de células apresentadoras de antígenos (APC do inglês *antigen presenting cell*), na regulação da expressão de MHC de classe I, na activação da morte de macrófagos e de patogénios intracelulares obrigatórios e tem, ainda, efeitos anti-proliferativos sobre as células infectadas por vírus e malignas.(29)

Embora seja claro que as células NK são parte do sistema hematopoiético, desenvolvendo-se na medula óssea, sendo derivadas de células progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>, o local de maturação e detalhes deste processo ainda não se encontram completamente explicados. A maturação destas células ainda não foi bem

evidenciado, mas julga-se que o desenvolvimento destas células pode não ocorrer inteiramente na medula óssea, uma vez que é possível observar-se duas subpopulações distintas destas células. Assim a evidência de uma população de células NK CD56<sup>bright</sup>, com elevada expressão de CD56 na sua superfície, pode ser isolada a partir de nódulos linfáticos e em amígdalas (tecido linfóide secundário (TLS)). As células NK CD56<sup>bright</sup> são relativamente dominantes no TLS comparado com a outra população de células NK CD56<sup>dim</sup> que expressam o CD56 em menor quantidade, mais abundante na medula óssea, sangue, e baço.(29)

### **2.2.1. Subtipos de Células *Natural Killer***

Geralmente, as células NK CD56<sup>dim</sup> (CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) são vistas como a subpopulação citotóxica das células NK enquanto as células NK CD56<sup>bright</sup> (CD56<sup>++</sup>) foram descritas como reguladoras, pela produção de citocinas, tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .(32)

De acordo com a densidade de expressão de CD56, as células NK, podem ser divididas em NK CD56<sup>dim</sup> representando a vasta maioria das células NK humanas e de uma pequena população distinta, as células NK CD56<sup>bright</sup>. Quase todas as células NK CD56<sup>bright</sup> deixam de expressar CD16 e exibem uma fraca actividade citotóxica. Nos seres humanos saudáveis, as células NK CD56<sup>bright</sup> compreendem até 10% de todas as células NK. Os grânulos de células NK CD56<sup>dim</sup> são mais ricos em perforina e granzima, o que resulta numa citólise mais eficaz em relação às células NK CD56<sup>bright</sup>. Contudo, as células NK CD56<sup>bright</sup> são mais eficientes na produção de citocinas pró-inflamatórias como é o caso do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$ .(30)

As células NK CD56<sup>bright</sup> são o subtipo predominante nas lesões inflamatórias mas as NK CD56<sup>dim</sup> também expressam receptores de quimiocinas que as podem levar para os locais de inflamação.(33)

As células NK CD56<sup>bright</sup> têm capacidade de produzir grandes quantidades de citocinas e quimiocinas após activação, no entanto têm pouca ou nenhuma capacidade para matar células lesionadas. Em oposição as células NK CD56<sup>dim</sup> têm uma capacidade relativamente menor para produção de citocinas em resposta à activação, no entanto a sua capacidade para a ocorrência de lise ocorre de forma facilitada.(29)

Parece evidente que as células NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup> têm papéis distintos e relativamente importantes durante a resposta imunológica. As células NK CD56<sup>bright</sup>, geralmente, precisam de dois sinais para produzir IFN- $\gamma$ , e um deles, inclui a mediação pela IL-12. O segundo pode ser impulsionado pelas interleucinas IL-1, IL-2, IL-15, IL-18,

ou pela ligação de um receptor de activação, como é o caso do CD16 (FcγRIIIa). Cada uma destas citocinas pode ser libertada a partir de monócitos, macrófagos e/ou células dendríticas, juntamente com IL-12, sugerindo uma interação entre as APCs e as células NK.(29)

A produção de IFN-γ e de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, tais como o TNF-α e o MIP-1α, do inglês *macrophage inflammatory protein-1α*, respectivamente, pode ocorrer dentro de minutos após a co-estimulação de monocinas, distinguindo estas células da resposta mais tardia de células T.(29)

### 2.2.2. Função citotóxica – Perforina e Granzima B

As células NK estão munidas por grânulos citotóxicos funcionais que contêm perforina e granzima, que são moléculas efectoras de citotoxicidade essenciais destas células. A perforina facilita a entrada de granzimas no citosol da célula alvo, através da formação de poros. Por sua vez, a granzima cliva várias pró-caspases, e outros substratos intracelulares iniciando a morte celular por apoptose.(34, 35)

As granzima A e B são os membros mais abundantes e mais bem caracterizados da família de proteinases que reside nos grânulos citolíticos das células NK, células T citotóxicas e outras células hematopoéticas. *In vitro*, a granzima B induz a morte celular programada dependente e independente da via das caspases, ao passo que a granzima A medeia o seu efeito, apenas, pela via independente das caspases.(36)

Estudos recentes evidenciam, que as células NK utilizam, preferencialmente, a granzima B para matar os seus alvos *in vitro*.(36)

O conhecimento da função da granzima *in vivo* é limitado. Sabe-se que são os principais agentes de indução de morte celular mediada pelas perforinas. Evidências recentes sugerem que a granzima A não é citotóxica, sendo apenas um modulador da inflamação.(36)

A forma como as perforinas transportam as granzimas para o citosol das células alvo não é totalmente conhecida. Julga-se que a entrada de granzimas no citoplasma da célula alvo ocorre diretamente após a formação de poros realizados pela perforina na membrana plasmática ou após o envolvimento de endolisossomas. De acordo com o modelo original, após a formação de um poro na membrana da célula, as granzimas passam para dentro da célula alvo e clivam os substratos específicos iniciando a fragmentação do DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) e causando a morte celular. Foi proposto também que as granzimas podem ser endocitadas independentemente da

perforina. A perforina pode também atuar para libertar granzimas que ficaram sequestradas nos endossomas, para se direcionarem para o citoplasma da célula alvo.(37)

### **2.2.3. Citocinas - IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$**

A ES tem características patogénicas interligadas envolvendo activação imune e fibrose, sendo que o envolvimento de células NK e de citocinas como o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  parece ser evidente. (38, 39)

O IFN- $\gamma$  é uma citocina com múltiplas funções imunorreguladoras que medeiam a defesa do hospedeiro contra vários agentes patogénicos. Os efeitos gerais do IFN- $\gamma$  incluem a activação de macrófagos, imunidade antiviral, aumento da expressão de moléculas de MHC, interação linfócito-endotelial, regulação da polarização das células T para Th1, proliferação celular e estimulação da apoptose. (40)

O IFN- $\gamma$  actua inibindo directamente a síntese de colagénio e em restabelecer o equilíbrio imunológico, daí ser uma citocina importante na ES.(41)

O TNF- $\alpha$  é conhecido como uma citocina pró-inflamatória multifuncional que está envolvido não só em vários processos fisiológicos, mas também em processos patológicos, incluindo a imunorregulação, inflamação, proliferação e apoptose. Esta citocina é, também, um dos componentes essenciais na patogénese de doenças imuno-inflamatórias. O TNF- $\alpha$  é assim uma citocina pró-inflamatória potente implicada na patogénese de doenças degenerativas, tais como AR, osteoartrite, e ES. Este actua após a sua activação que ocorre devido a uma conversão proteolítica. Após trimerização, o TNF- $\alpha$  liga-se a dois receptores diferentes, que se encontram na membrana, activando-os. Estes receptores são do tipo I e tipo II, sendo a maioria dos efeitos traduzidos pelo receptor de tipo I. (42-45)

### **2.2.4. Moléculas de adesão – CD49e, CD29 e LAIR-1**

A fase inflamatória no endotélio vascular é comparada a uma sobrerregulação de moléculas de adesão, tais como a ICAM-1 e a VCAM-1, em resposta a diversas citocinas e mediadores celulares como é o caso do IFN- $\gamma$ , IL-1 e TNF- $\alpha$ . Estas moléculas de adesão são importantes no recrutamento de monócitos para a área de inflamação, uma vez que facilitam os processos de adesão e transmigração.(41)

Uma ampla variedade de moléculas de adesão celular (CAMs do inglês *cell adhesion molecules*) são detetáveis nas células NK circulantes como é o caso do CD29

( $\beta_1$ ) e do CD49e ( $\alpha_5$ ). Entre as CAMs, as integrinas  $\beta_2$  têm um papel importante na transdução de sinal e na activação de células NK, enquanto que as integrinas  $\beta_1$ , especificamente a VLA-4 e VLA-5 ( $\alpha_5\beta_1$ ) (receptores para fibronectina) e VLA-6 (receptor de laminina) promovem a ligação de células NK à matriz extracelular e aos alvos celulares.(46, 47)

As integrinas são moléculas heterogénias ligadas de forma não covalente, constituídas por um subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ , em que ambas são necessárias para criar um local de ligação funcional na parte digital de membrana do receptor de superfície celular para ligandos específicos extracelulares. A afinidade de ligação do ligando à integrina pode ser modulada alostericamente por mudanças conformacionais que ocorrem no exterior da bolsa de ligação.(48)

#### **2.2.4.1. CD49e (integrina $\alpha_5$ )**

O CD49e ou a integrina  $\alpha_5$  é uma subunidade de integrinas com capacidade de ligação à subunidade  $\beta_1$  formando uma integrina composta,  $\alpha_5\beta_1$  ou VLA-5. Esta integrina é um receptor clássico de fibronectina, que desempenha um papel importante na biologia vascular, incluindo vasculogénese embrionária, remodelação vascular, angiogénese patológica e inflamação. Em resposta a factores pró-angiogénicos, a  $\alpha_5\beta_1$  promove a adesão de células endoteliais (CE), bem como a sua migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação.(49, 50)

A subunidade  $\beta_1$  tem a capacidade de reconhecer uma grande variedade de ligandos. A junção das subunidades  $\beta_1$  com  $\alpha_5$  origina a integrina  $\alpha_5\beta_1$  um dos receptores heterodímeros da fibronectina.(48)

As integrinas não têm actividade enzimática intrínseca e a sua capacidade para realizar transdução de sinal depende do recrutamento de proteínas citoplasmática de sinalização. Os níveis da integrina  $\alpha_5\beta_1$  na superfície da célula são mantidas através da reciclagem de complexos por endocitose de volta para a membrana plasmática. A internalização dos complexos de integrina  $\alpha_5\beta_1$  ocorre através das vias de clatrina-dependente e clatrina- independente.(51)

Relativamente às subpopulações da célula NK, as células NK CD56<sup>bright</sup> expressam em maior quantidade o CD49e (CD49e<sup>++</sup>) relativamente às NK CD56<sup>dim</sup> (CD49e<sup>+</sup>). (52)



#### **2.2.4.2. CD29 (integrina $\beta_1$ )**

As células NK têm a capacidade de aderir a elementos do estroma da medula óssea, incluindo fibroblastos, fibronectina e laminina, mas não ao colagénio tipo I, ao ácido hialurónico e à vitronectina. A fibronectina e a laminina ligam-se às integrinas  $\beta_1$ , formando complexos como o VLA-4, o VLA-5 e o VLA-6.(53)

A subunidade  $\beta_1$ , que representa a maior subfamília do grupo das integrinas, promove processos celulares fundamentais tais como migração, proliferação, sobrevivência, diferenciação e é indispensável para o desenvolvimento e a homeostase do tecido.(54)

Dos vários tipos de receptores a integrina  $\beta_1$  é, de longe, a mais presente, permitindo detectar uma grande variedade de estímulos que podem ser mediados por toxinas, hormonas, neurotransmissores, proteínas e macromoléculas. Foi já evidenciado um papel potencial da integrina  $\beta_1$  no desenvolvimento e reparação de tecidos. De facto, é claro que a integrina  $\beta_1$  desempenha um papel crucial durante o desenvolvimento pós-natal da pele e cicatrização de feridas. A perda de integrina  $\beta_1$  do epitélio pode causar defeitos ao nível da cicatrização de feridas.(55)

A expressão de integrina  $\beta_1$  por fibroblastos, por exemplo, é necessária para que ocorra a fibrogénese. A inibição da integrina  $\beta_1$  pode ser um método viável para reduzir o desenvolvimento de ES.(56)

#### **2.2.4.3. Receptor da imunoglobulina do tipo I associado aos leucócitos - LAIR-1**

O receptor da imunoglobulina do tipo I associado aos leucócitos (LAIR-1 do inglês ou CD305) é uma glicoproteína transmembranar pertencente à superfamília das Igs e é expressa na maioria das células hematopoiéticas, incluindo as células T, células B, células NK, monócitos, células dendríticas e granulócitos.(57)

O LAIR-1 pertence à família de receptores inibitórios do sistema imunológico, os quais estão envolvidos no controlo do equilíbrio do sistema imunitário para prevenir a activação inadequada ou sobreactivação, que pode resultar em danos nos tecidos ou doenças auto-imunes.(58)

A ligação cruzada de LAIR-1 em células NK fornece um sinal potente e inibidor que é capaz de reduzir a lise de células alvo. A cauda citoplasmática do LAIR-1 contém imunoreceptores com motivos de inibição baseados em tirosina (ITIM do inglês *immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*). Mediante acoplamento da porção extracelular de LAIR1, os ITIM citoplasmáticos ligam-se ao domínio SH<sub>2</sub> das fosfatases,

conduzindo à inactivação de diferentes cinases e à subregulação da activação celular.  
(59)

Os colagénios são ligandos funcionais para o LAIR-1 e a interacção deste com o colagénio inibe, directamente, a activação de células imunes.(60)

Foi observado, em alguns estudos, que a produção de Ig em doentes com LES, pode ser desregulada, em parte, devido à não expressão do receptor de inibição LAIR-1 pelas células B.(60)

## *Objetivos*

---

O objectivo principal deste estudo foi caracterizar fenotípica e funcionalmente as células NK e verificar se os parâmetros estudados se relacionavam com o subtipo de Esclerose Sistémica e com os parâmetros clínicos de severidade desta doença, como a fibrose pulmonar (FP) e a presença de úlceras digitais (UD), contribuindo assim para um melhor conhecimento da fisiopatologia da ES.

Como objectivos específicos que visam a realização do objectivo geral:

1. Caracterizar fenotipicamente, com base na expressão de CD49e, CD29 e LAIR-1, as duas subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) na ESL e na ESD *versus* Controlo;
2. Caracterizar funcionalmente, com base nas citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , as duas subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) na ESL e na ESD *versus* Controlo;
3. Caracterizar a capacidade citotóxica, com base na granzima B e na perforina, as duas subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) na ESL e na ESD *versus* Controlo.

## *Materials e Métodos*

---

## 1. Grupos de estudo

Para realizar este estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico de um grupo de indivíduos com ES e de um grupo controlo. A recolha das amostras do sangue periférico (SP) decorreu no Serviço de Reumatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e no Centro de Histocompatibilidade do Centro, em tubos de heparina. Todos os doentes com ES preenchem os critérios preliminares definidos pelo Colégio Americano de Reumatologia.(61) Este estudo teve o consentimento informado (respeitando os princípios da Declaração de Helsínquia) de todos os doentes/controlos que participaram, sendo que o protocolo de estudo foi aprovado pelo Comité de Ética do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra.

Do grupo controlo fizeram parte 16 mulheres e 3 homens, adultos saudáveis, isentos de doenças inflamatórias, com uma média de idades de  $51,1 \pm 10,1$  e  $53 \pm 16,4$  anos, respetivamente. Os doentes com ES foram subdivididos consoante o subtipo clínico da doença, de acordo com *LeRoy* (62): o grupo de doentes com ESL era constituído por 24 mulheres e 6 homens com uma média de idades de  $58,5 \pm 13,7$  e  $51,8 \pm 11,9$  anos, respetivamente; o grupo de doentes com ESD era constituído por 7 mulheres e 3 homens com uma média de idades de  $53,6 \pm 8,5$  e  $60,3 \pm 11,0$  anos. As características clínicas dos doentes com ES estão representados na tabela I.

**Tabela I** - Características clínicas dos doentes com ES.

	<b>ES limitada (n=30)</b>	<b>ES difusa (n=10)</b>
<b>Duração da doença após diagnóstico (anos)</b>	9,77 $\pm$ 8,10	8,5 $\pm$ 9,2
<b>Presença de anticorpos antinucleares isolados</b>	30,0 % (n=9)	0,00 %
<b>Presença do Anticorpo Scl-70</b>	0,00 %	100 %
<b>Presença do Anticorpo anti-centrómero</b>	70,0 % (n=21)	0,00 %
<b>Espessamento da pele (Score de Rodnan modificado)</b>	10,4 $\pm$ 6,45	17,2 $\pm$ 10,7
<b>Úlceras ou história</b>	33,3 % (n=10)	40 % (n=4)
<b>Hipertensão pulmonar</b>	6,67 % (n=2)	40 % (n=4)
<b>Fibrose pulmonar</b>	26,7 % (n=8)	50 % (n=5)
<b>Capacidade de difusão pulmonar de CO</b>	95,6 $\pm$ 19,5	86,4 $\pm$ 13,6
<b>Tratamento</b>		
<b>Vasodilatadores</b>	100 %	100 %
<b>Imunosupressores</b>	16,67 % (n=5)	0 %
<b>Corticoides</b>	43,3 (n=13)	40 % (n=4)
<b>IECA</b>	26,67 % (n=8)	20 % (n=2)

No âmbito deste estudo os doentes com ES foram, ainda, divididos consoante o tempo de duração da doença após diagnóstico, de acordo com Coriveau (63): Grupo 1 (*Early-Stage*) – Doença diagnosticada há menos de um ano (inclusive); Grupo 2 (*Mid-Stage*) – Doença diagnosticada há mais de um ano e menos de dez anos (inclusive); Grupo 3 (*Late-Stage*) – Doença diagnosticada há mais de dez anos.

## **2.1. Caracterização fenotípica das células *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural killer* CD56<sup>bright</sup>**

Para a quantificação e caracterização funcional das células NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup> foram adicionados a 250µl de SP, e os seguintes anticorpos monoclonais: 10 µl de anti-CD3 (Clone UCHT1; BD Pharmingen, EUA), e 10 µl de anti-CD49e (Clone SAM1; Beckman Coulter Immunotech, Marseille France) conjugados com Fluoresceína de Isotiocianato (FITC), anti-CD56 conjugado com Ficoeritrina Cianina 7 (PC7) (Clone NKH-1; Beckman Coulter, Marseille France), 10 µl de anti-HLA-DR conjugado com Proteína Piridina – Clorofila Cianina 5.5 (PerCP cy 5.5) (Clone G46-6; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 1 µl de anti- LAIR-1 conjugado com Ficoeritrina (PE) (Clone DX26; BD Pharmingen, San Diego, CA,USA) e 10 µl d anti-CD29 conjugado com Alofocianina 7 (APC-cy7) (Clone TS2/16; Biolegend, San Diego, CA,USA). Foram incubados durante 10 minutos (min) à temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz. De seguida, procedeu-se à lise dos eritrócitos, adicionando-se 2 ml de *FACS Lysing Solution* (1X) (Becton Dickinson Biosciences, U.S.A), previamente diluído a 1:10 em água destilada. Incubou-se durante 10 min à TA e ao abrigo da luz. Centrifugou-se durante 5 min a 540xg e decantou-se o sobrenadante. Por fim, adicionou-se 1 ml de *Phosphate-Buffered Saline* (1X) (PBS, pH 7.4, 10x GIBCO, U.S:A) previamente diluído a 1:10 em água destilada. Centrifugou-se a 540xg durante 5 min. Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 250ml de PBS (1x). Por fim, adquiriu-se as amostras no citómetro de fluxo.

## **2.2. Caracterização funcional/citotóxica das células *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural Killer* CD56<sup>bright</sup> no sangue periférico.**

A avaliação da capacidade citotóxica dos subtipos de linfócitos das células NK, do SP, foi realizado um protocolo de permeabilização intracitoplasmática, usando-se o *kit IntraPrep* (Beckman Coulter, Brea, CA. EUA). A 250µl de sangue periférico, adicionou-se os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 conjugado com *Pacific Blue (PB)* (Clone UCHT1; BD Pharmingen, EUA) e anti-CD56 conjugado Ficoeritina Cianina (PC5) (Clone NKH-1; Beckman Coulter, Marseille France). Incubou-se durante 10 min, à TA e ao abrigo da luz. Adicionou-se 200µl de solução A do *kit IntraPrep* (Beckman Coulter, Brea, CA. EUA). Incubou-se durante 10 min, à TA e ao abrigo da luz, e seguidamente adicionou-se 1,5 ml de PBS (1X) (pH 7.4, 10x GIBCO, U.S:A) Centrifugou-se durante 5 min a 540xg e decantou-se o sobrenadante. Adicionou-se 200µl da solução B do *kit IntraPrep* (Beckman Coulter, Brea, CA. EUA). Seguidamente, adicionou-se o anticorpo monoclonal anti-Perforina conjugada com FITC (Clone δ G9, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) e anti- Granzima B conjugado com PE (Clone CLB-GB11; Immunogen, Amsterdam, Netherlands). Seguiu-se um período de incubação de 10 min à TA, e ao abrigo da luz. Após este período de incubação adicionou-se 2 ml de PBS (pH 7.4, 10x GIBCO, U.S:A), centrifugou-se durante 5 minutos a 540xg e decantou-se o sobrenadante, sendo que, este procedimento foi realizado por duas vezes. Ressuspendeu-se com 250µl de PBS (pH 7.4, 10x GIBCO, U.S:A) e por fim, adquiriu-se as amostras no citometro de fluxo.

## **2.3. Estimulação *in vitro* das células *Natural Killer***

Para quantificação da produção de citocinas pelas células NK, foi inicialmente necessário estimular as células *in vitro*. A 500 µL do sangue periférico foi adicionado a 500 µl de Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Gibco; Painactive SLEy, Escócia, Reino Unido) suplementado com 2 mM L-glutamina. A este meio adicionou-se ainda 10 µg/ml Brefeldina A (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), 50 ng/ml de acetato de forbol miristato (PMA do inglês *phorbol* 12-myristate 13-acetate) (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e 1 µg/ml de Ionomicina (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), tendo incubado em ambiente húmido e estéril durante 4 horas, a 37°C e com uma concentração de 5% de CO<sub>2</sub>.



#### **2.4. Caracterização funcional das células *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural Killer* CD56<sup>bright</sup> no sangue periférico**

Após as 4 horas de incubação, recorreu-se a um protocolo de permeabilização intracitoplasmática previamente descrito no ponto 2.3. Deste modo foram utilizados dois tubos para a avaliação da capacidade citotóxica dos subtipos de linfócitos das células NK, do sangue periférico. A 250µl de sangue periférico, adicionou-se os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 conjugado com PB (Clone UCHT1; BD Pharmingen, EUA), anti-CD56 conjugado PC7 (Clone NKH-1; Beckman Coulter, Marseille France). Seguidamente, adicionou-se o anticorpo monoclonal Anti-TNF-α conjugado com FITC (Clone MAb11, BD Pharmingen, EUA) e Anti-IFN-γ conjugado com FITC (Clone 4S.B3; BD Pharmingen, EUA). Seguiu-se um período de incubação de 10 min à TA, e ao abrigo da luz. Após este período de incubação adicionou-se 2 ml de PBS (pH 7.4, 10x GIBCO, U.S:A), centrifugou-se durante 5 min a 540xg e decantou-se o sobrenadante, sendo que, este procedimento foi realizado por duas vezes. Ressuspendeu-se com 250µl de PBS (pH 7.4, 10x GIBCO, U.S:A) e por fim, adquiriu-se as amostras no citómetro de fluxo.

### **3. Citometria de fluxo e análise dos resultados**

A aquisição das amostra foi realizada no citómetro de fluxo FACS-Canto II (BDB, San José, Califórnia, EUA) com recurso à aplicação informática FACSDiva (BDB, San José, Califórnia, EUA). Recorreu-se ao programa Infinicyt 1.5 (Cytognos, Salamanca, Espanha) para se efetuar a análise dos dados obtidos no citómetro de fluxo.

As células NK foram identificados pela expressão de CD56, pela ausência de CD3 e pela sua posição típica no *dot plot Forward-scattered light (FSC) versus Side-scattered light (SSC)*. A identificação de cada subtipo da célula NK foi feita, de acordo com, a expressão de CD56+ (NK CD56<sup>dim</sup>) e CD56++ (NK CD56<sup>bright</sup>). A identificação das células que se encontravam a expressar CD56, foi feita com base na expressão forte deste marcador.

Os valores absolutos foram calculados utilizando uma dupla metodologia: citometria de fluxo e contador hematológico (A<sup>C</sup> Tdiff 2, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA).

#### **4. Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o *software* Statistical Package for the Social Sciences 17.0 (SPSS) (IBM, New York, EUA) sendo apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão. O teste utilizado neste estudo foi o não-paramétrico de *Mann-Whitney U*, para amostras independentes. Todas as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o *p-value* foi inferior a 0,05.

## *Resultados:*

---

Foi realizada uma caracterização fenotípica e funcional bastante completa das diferentes subpopulações de células NK. Dentro de cada subpopulação procedeu-se à análise da expressão de receptores e da produção de citocinas. Foi também analisada a quantidade da expressão de determinada citocina ou receptor pela determinação da Intensidade Média de Fluorescência (MIF).

## **1. Quantificação de células *Natural Killer* e suas subpopulações, *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural Killer* CD56<sup>bright</sup>, no sangue periférico**

### **1.1. Percentagem e valor absoluto das células *Natural Killer* totais e das duas subpopulações, *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural Killer* CD56<sup>bright</sup> no sangue periférico, de acordo com o subtipo, presença de fibrose pulmonar e episódios de úlceras digitais**

Pela análise da **Tabela II**, verificou-se que a frequência e o valor absoluto das células NK totais encontravam-se diminuídos em doentes com ESL, embora sem atingir significado estatístico.

Observou-se uma diminuição estatisticamente significativa nos doentes com FP, na frequência e valor absoluto de células NK e das suas subpopulações, quando comparado com os doentes sem FP e com o grupo controlo.

Embora sem significado estatístico, parece ocorrer um aumento de células NK ao longo do tempo de duração da doença.

**Tabela II** - Percentagem e Valor Absoluto (V.A.; cel/ $\mu$ l) das células NK totais e das duas subpopulações, NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>, em Esclerose Sistémica Difusa, e em Esclerose Sistémica Limitada e no grupo controlo. Dos doentes com Esclerose Sistémica foram analisados parâmetros clínicos de severidade da doença.

		Controlo	ESD	ESL	Com Úlcera Digital	Sem Úlcera Digital	Com Fibrose Pulmonar	Sem Fibrose Pulmonar	Duração da doença <1 ano	Duração da doença entre 1-10 anos	Duração da doença >10 anos
NK Totais	%	3,40 ± 1,60	2,80 ± 1,79	2,77 ± 2,10	2,28 ± 1,11 <sup>a</sup>	3,04 ± 2,33	1,75 ± 1,00 <sup>b c</sup>	3,11 ± 2,16	2,10 ± 1,32	2,81 ± 2,20	3,08 ± 2,03
	V.A.	258 ± 132	264 ± 176	198 ± 155	179 ± 84	235 ± 182	134 ± 94 <sup>c b</sup>	245 ± 167	196 ± 105	200 ± 146	237 ± 195
NK CD56 <sup>dim</sup>	%	90,52 ± 7,76	93,50 ± 2,97	91,16 ± 3,76	90,73 ± 3,02	92,16 ± 3,97	92,03 ± 3,62	91,55 ± 3,78	90,01 ± 1,32	91,32 ± 4,33	92,44 ± 3,32
	V.A.	237 ± 127	248 ± 170	182 ± 148	163 ± 78	219 ± 175	124 ± 87 <sup>c b</sup>	227 ± 161	177 ± 96	184 ± 141	222 ± 186
NK CD56 <sup>bright</sup>	%	9,49 ± 7,75	6,50 ± 2,97	8,84 ± 3,76	9,27 ± 3,02	7,84 ± 3,97	7,97 ± 3,62	8,45 ± 3,78	10,00 ± 1,32	8,68 ± 4,33	7,56 ± 3,32
	V.A.	19 ± 11	15 ± 9	16 ± 10	16 ± 8	16 ± 11	10 ± 8 <sup>c b</sup>	18 ± 9	20 ± 9	16 ± 9	15 ± 11

Legenda: a) Controlo *versus* Doentes com Úlcera Digital,  $p < 0,05$ ; b) Doentes com Fibrose Pulmonar *versus* Doentes sem Fibrose Pulmonar,  $p < 0,05$ ; c) Controlo *versus* Doentes com Fibrose Pulmonar,  $p < 0,05$ .

## 1.2. Caracterização fenotípica e funcional das duas subpopulações de células Natural Killer, Natural Killer CD56<sup>dim</sup> e Natural Killer CD56<sup>bright</sup>, nos dois subtipos de Esclerose Sistémica, difusa e limitada.

Pela análise da **Tabela III**, observou-se uma diminuição da expressão da molécula de adesão CD49e em ambas subpopulações de células NK e em ambos os subtipos da doença, sendo esta mais acentuada em ESL, atingindo significado estatístico. Pelo contrário, observou-se um aumento da expressão de LAIR-1, principalmente em ESL, também com significado estatístico. Já a expressão da molécula de adesão CD29 não evidencia qualquer alteração considerável.

Relativamente á capacidade citotóxica das células NK avaliada pela frequência destas células a expressar granzima B e perforina, bem como, pela expressão destas duas moléculas no citoplasma da célula, observou-se nas células NK CD56<sup>dim</sup>, um aumento da frequência destas células a expressar granzima B e da expressão desta proteína, principalmente em ESL. Nas células NK CD56<sup>bright</sup>, detectou-se um aumento da frequência destas células a expressar granzima B e perforina, sendo para esta última, mais acentuado em ESL.

Ainda no sentido de melhor caracterizar funcionalmente as células NK, fomos estudar a sua capacidade para produzir citocinas inflamatórias após estimulação *in vitro* com

PMA e ionomicina. Neste estudo apenas se observou uma ligeira diminuição da quantidade de TNF- $\alpha$  produzida por célula nos doentes com ES, embora sem atingir significado estatístico.

**Tabela III** – Frequência das duas subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) a expressar moléculas de adesão, perforina, granzima B, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e expressão de cada um dos parâmetros nas 2 subpopulações de células NK em doentes com Esclerose Sistêmica Difusa em Esclerose Sistêmica Limitada e no grupo controlo.

			Controlo	ESD	ESL
NK CD56 <sup>dim</sup>	CD49e	MIF	431 $\pm$ 80	323 $\pm$ 115	273 $\pm$ 83 <sup>b</sup>
		LAIR-1	1670 $\pm$ 587	1809 $\pm$ 646	2175 $\pm$ 704 <sup>b</sup>
NK CD56 <sup>bright</sup>	CD49e	MIF	692 $\pm$ 147	373 $\pm$ 139 <sup>a</sup>	343 $\pm$ 91 <sup>b</sup>
		LAIR-1	1514 $\pm$ 343	1942 $\pm$ 422 <sup>a</sup>	2022 $\pm$ 646 <sup>b</sup>
NK C56 <sup>dim</sup>	CD29	MIF	2509 $\pm$ 587	2525 $\pm$ 957	2548 $\pm$ 679
		%	30 $\pm$ 6	35 $\pm$ 14	35 $\pm$ 13
NK CD56 <sup>bright</sup>	CD29	MIF	2435 $\pm$ 535	2526 $\pm$ 860	2614 $\pm$ 752
		%	34 $\pm$ 7	38 $\pm$ 13	40 $\pm$ 12
NK CD56 <sup>dim</sup>	Perforina	%	69,73 $\pm$ 23,73	70,04 $\pm$ 19,14	70,58 $\pm$ 25,64
		MIF	1114 $\pm$ 647	1264 $\pm$ 624	1239 $\pm$ 608
	Granzima B	%	72,81 $\pm$ 22,46	82,04 $\pm$ 14,03	86,83 $\pm$ 14,78
		MIF	1508 $\pm$ 1062	1547 $\pm$ 741	2028 $\pm$ 1278
NK CD56 <sup>bright</sup>	Perforina	%	14,23 $\pm$ 11,30	27,60 $\pm$ 20,61	25,99 $\pm$ 19,33 <sup>b</sup>
		MIF	904 $\pm$ 506	1022 $\pm$ 396	971 $\pm$ 429
	Granzima B	%	26,87 $\pm$ 23,93	50,23 $\pm$ 22,96 <sup>a</sup>	62,02 $\pm$ 28,19
		MIF	1150 $\pm$ 668	1166 $\pm$ 469	1382 $\pm$ 745
NK CD56 <sup>dim</sup>	TNF- $\alpha$	%	43,40 $\pm$ 19,89	39,84 $\pm$ 19,90	38,67 $\pm$ 19,43
		MIF	4247 $\pm$ 2235	3303 $\pm$ 1055	3511 $\pm$ 1634
	IFN- $\gamma$	%	44,95 $\pm$ 19,31	36,74 $\pm$ 19,08	40,18 $\pm$ 15,86
		MIF	902 $\pm$ 293	817 $\pm$ 187	871 $\pm$ 390
NK CD56 <sup>bright</sup>	TNF- $\alpha$	%	33,87 $\pm$ 19,05	34,87 $\pm$ 23,65	31,89 $\pm$ 18,65
		MIF	2384 $\pm$ 1085	2139 $\pm$ 949	2101 $\pm$ 1015
	IFN- $\gamma$	%	35,33 $\pm$ 19,88	31,41 $\pm$ 18,82	38,29 $\pm$ 16,79
		MIF	801 $\pm$ 227	806 $\pm$ 195	766 $\pm$ 211

Legenda: a) Controlo versus ESD  $p < 0,05$ ; b) Controlo versus ESL,  $p < 0,05$ .

**1.3. Caracterização fenotípica e funcional das duas subpopulações de células *Natural Killer*, *Natural Killer CD56<sup>dim</sup>* e *Natural Killer CD56<sup>bright</sup>*, em doentes com Esclerose Sistémica na presença ou ausência de Úlcera Digital.**

Pela análise da **Tabela IV**, observou-se uma diminuição, estatisticamente significativa, da expressão da molécula de adesão CD49e em ambas subpopulações de células NK e em ambos os grupos de doentes em estudo, sendo esta mais acentuada na presença de UD. Pelo contrário, observou-se um aumento da expressão de LAIR-1, principalmente em doentes com ES não portadores de UD, sendo este valor estatisticamente significativo. Relativamente à molécula CD29 não foram observados qualquer tipo de diferenças entre os grupos em estudo.

Relativamente à capacidade citotóxica das células NK avaliada pela frequência destas células a expressar granzima B e perforina, bem como, pela expressão destas duas moléculas no citoplasma da célula, observou-se nas células NK CD56<sup>dim</sup>, um aumento da frequência destas células a expressar granzima B e da expressão desta proteína, principalmente em doentes com ES portadores de UD. Nestes doentes observou-se, ainda, um aumento da expressão de perforina, ainda que sem significado estatístico. Nas células NK CD56<sup>bright</sup>, detectou-se um aumento da frequência destas células a expressar granzima B e perforina, de uma forma mais acentuada em doentes com ES portadores de UD.

Relativamente a frequência de células NK a produzir citocinas não se observaram diferenças estatisticamente significativas.



**Tabela IV** - Frequência das 2 subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) a expressar moléculas de adesão (CD49e e LAIR-1), perforina, granzima B, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e expressão de cada um dos parâmetros nas 2 subpopulações de células NK em doentes com Esclerose Sistémica na presença e ausência de Úlcera Digital.

			Controlo	Doentes com Úlcera Digital	Doentes sem Úlcera Digital
NK CD56 <sup>dim</sup>	CD49e	MIF	431 $\pm$ 80	270 $\pm$ 88 <sup>a</sup>	292 $\pm$ 94 <sup>b</sup>
		LAIR-1	1670 $\pm$ 587	2157 $\pm$ 849	2061 $\pm$ 635 <sup>b</sup>
NK CD56 <sup>bright</sup>	CD49e	MIF	692 $\pm$ 147	338 $\pm$ 107 <sup>a</sup>	356 $\pm$ 102 <sup>b</sup>
		LAIR-1	1514 $\pm$ 343	1942 $\pm$ 792	2032 $\pm$ 498 <sup>b</sup>
NK CD56 <sup>dim</sup>	CD29	MIF	2509 $\pm$ 587	2519 $\pm$ 356	2554 $\pm$ 867
		%	30 $\pm$ 6	32 $\pm$ 9	36 $\pm$ 14
NK CD56 <sup>bright</sup>	CD29	MIF	2435 $\pm$ 534	2487 $\pm$ 429	2645 $\pm$ 87
		%	34 $\pm$ 7	36 $\pm$ 13	41 $\pm$ 13
NK CD56 <sup>dim</sup>	Perforina	%	69,73 $\pm$ 23,73	75,31 $\pm$ 22,20	67,86 $\pm$ 25,32
		MIF	1114 $\pm$ 647	1416 $\pm$ 665	1152 $\pm$ 559
	Granzima B	%	72,81 $\pm$ 22,46	86,58 $\pm$ 16,75	85,36 $\pm$ 13,65
		MIF	1508 $\pm$ 1062	2083 $\pm$ 1188	1839 $\pm$ 1205
NK CD56 <sup>bright</sup>	Perforina	%	14,23 $\pm$ 11,30	29,17 $\pm$ 24,02	24,72 $\pm$ 16,48 <sup>b</sup>
		MIF	904 $\pm$ 506	946 $\pm$ 425	1002 $\pm$ 422
	Granzima B	%	26,87 $\pm$ 23,93	62,75 $\pm$ 29,75 <sup>a</sup>	57,71 $\pm$ 26,37 <sup>b</sup>
		MIF	1150 $\pm$ 668	1254 $\pm$ 613	1376 $\pm$ 741
NK CD56 <sup>dim</sup>	TNF- $\alpha$	%	43,40 $\pm$ 19,89	41,21 $\pm$ 19,84	37,86 $\pm$ 19,30
		MIF	4247 $\pm$ 2235	3107 $\pm$ 1208	3632 $\pm$ 1634
	IFN- $\gamma$	%	44,95 $\pm$ 19,31	42,85 $\pm$ 17,34	37,79 $\pm$ 16,18
		MIF	902 $\pm$ 293	797 $\pm$ 189	885 $\pm$ 403
NK CD56 <sup>bright</sup>	TNF- $\alpha$	%	33,87 $\pm$ 19,05	40,51 $\pm$ 23,10	28,73 $\pm$ 16,81
		MIF	2384 $\pm$ 1085	2011 $\pm$ 737	2157 $\pm$ 210
	IFN- $\gamma$	%	35,33 $\pm$ 19,88	42,66 $\pm$ 16,13	33,96 $\pm$ 17,40
		MIF	801 $\pm$ 227	758 $\pm$ 202	783 $\pm$ 211

Legenda: a) Controlo *versus* Doentes com Úlcera Digital,  $p < 0,05$ ; b) Controlo *versus* Doentes sem Úlcera Digital,  $p < 0,05$ .

**1.4. Caracterização fenotípica e funcional das duas subpopulações de células *Natural Killer*, *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural Killer* CD56<sup>bright</sup>, em doentes com Esclerose Sistémica na presença ou ausência de Fibrose Pulmonar.**

Pela observação da **Tabela V**, verificou-se uma diminuição, estatisticamente significativa, da expressão da molécula de adesão CD49e em ambas subpopulações de células NK e em ambos os grupos de doentes com ES, com e sem FP. Pelo contrário, observou-se um aumento da expressão de LAIR-1, principalmente em doentes com ES portadores de FP, também com significado estatístico. Já a expressão da molécula de adesão CD29 não evidencia qualquer alteração considerável.

Relativamente à capacidade citotóxica das células NK avaliada pela frequência destas células a expressar granzima B e perforina, bem como, pela expressão destas duas moléculas no citoplasma da célula, observou-se em ambos os subtipos de células NK, um aumento da frequência destas células a expressar granzima B e perforina e da expressão destas proteínas, sendo este aumento mais acentuado em doentes com ES portadores de FP.

Relativamente a frequência de células NK a produzir citocinas não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela V** – Frequência das 2 subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) a expressar moléculas de adesão (CD49e e LAIR-1), perforina, granzima B, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e expressão de cada um dos parâmetros nas 2 subpopulações de células NK em doentes com Esclerose Sistémica para o parâmetro de Fibrose Pulmonar.

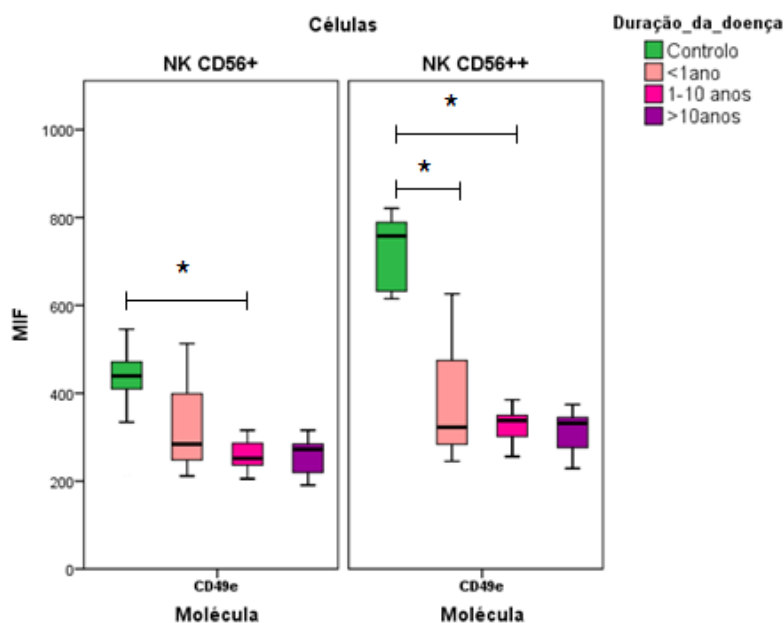
			Controlo	Doentes com Fibrose Pulmonar	Doentes sem Fibrose Pulmonar
NK CD56 <sup>dim</sup>	CD49e	MIF	431 $\pm$ 80	288 $\pm$ 128 <sup>a</sup>	284 $\pm$ 84 <sup>b</sup>
		MIF	1670 $\pm$ 587	2157 $\pm$ 833	2070 $\pm$ 665
NK CD56 <sup>bright</sup>	CD49e	MIF	692 $\pm$ 147	348 $\pm$ 162 <sup>a</sup>	350 $\pm$ 87 <sup>b</sup>
		MIF	1514 $\pm$ 343	2157 $\pm$ 742 <sup>a</sup>	1953 $\pm$ 547 <sup>b</sup>
NK CD56 <sup>dim</sup>	CD29	MIF	2509 $\pm$ 586	2447 $\pm$ 439	2574 $\pm$ 819
		%	30 $\pm$ 6	39 $\pm$ 12	34 $\pm$ 13
NK CD56 <sup>bright</sup>	CD29	MIF	2435 $\pm$ 535	2337 $\pm$ 427	2680 $\pm$ 841
		%	34 $\pm$ 7	42 $\pm$ 13	39 $\pm$ 13
NK CD56 <sup>dim</sup>	Perforina	%	69,73 $\pm$ 23,73	78,88 $\pm$ 24,35	67,67 $\pm$ 23,97
		MIF	1114 $\pm$ 647	1490 $\pm$ 771	1162 $\pm$ 527
	Granzima B	%	72,81 $\pm$ 22,46	88,20 $\pm$ 17,80	84,99 $\pm$ 13,63
		MIF	1508 $\pm$ 1062	2412 $\pm$ 1425	1764 $\pm$ 1083
NK CD56 <sup>bright</sup>	Perforina	%	14,23 $\pm$ 11,30	33,88 $\pm$ 22,33 <sup>a</sup>	23,71 $\pm$ 17,87
		MIF	904 $\pm$ 506	924 $\pm$ 417	1001 $\pm$ 424
	Granzima B	%	26,87 $\pm$ 23,93	63,36 $\pm$ 27,45 <sup>a</sup>	58,16 $\pm$ 27,59 <sup>b</sup>
		MIF	1150 $\pm$ 668	1305 $\pm$ 675	1344 $\pm$ 711
NK CD56 <sup>dim</sup>	TNF- $\alpha$	%	43,40 $\pm$ 19,89	50,87 $\pm$ 17,73	35,07 $\pm$ 18,40 <sup>c</sup>
		MIF	4247 $\pm$ 2235	3991 $\pm$ 2068	3296 $\pm$ 1289
	IFN- $\gamma$	%	44,95 $\pm$ 19,31	47,47 $\pm$ 12,93	36,48 $\pm$ 16,84 <sup>c</sup>
		MIF	902 $\pm$ 293	832 $\pm$ 186	867 $\pm$ 396
NK CD56 <sup>bright</sup>	TNF- $\alpha$	%	33,87 $\pm$ 19,05	39,66 $\pm$ 21,22	30,20 $\pm$ 18,79
		MIF	2384 $\pm$ 1085	1948 $\pm$ 728	2163 $\pm$ 1066
	IFN- $\gamma$	%	35,33 $\pm$ 19,88	34,82 $\pm$ 16,64	37,30 $\pm$ 17,76
		MIF	801 $\pm$ 227	777 $\pm$ 219	775 $\pm$ 205

Legenda: a) Controlo *versus* Doentes com Fibrose Pulmonar,  $p < 0,05$ ; b) Controlo *versus* Doentes sem Fibrose Pulmonar,  $p < 0,05$ ; c) Doentes com Fibrose Pulmonar *versus* doentes sem Fibrose Pulmonar,  $p < 0,05$ .

### 1.5. Caracterização fenotípica e funcional das duas subpopulações de células *Natural Killer*, *Natural Killer CD56<sup>dim</sup>* e *Natural Killer CD56<sup>bright</sup>*, em doentes com Esclerose Sistémica de acordo com a duração da doença

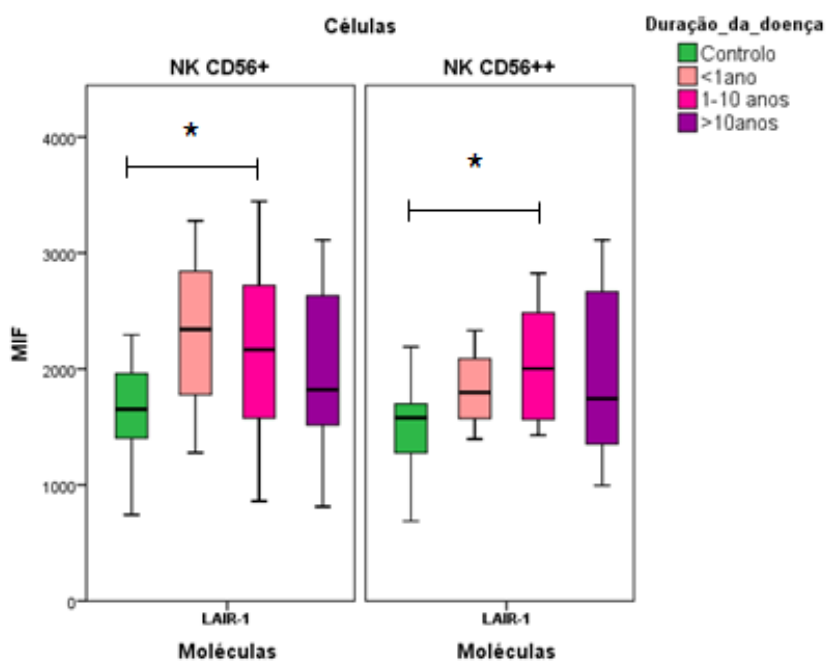
Ao analisarmos a variação da expressão do CD49e, de acordo com a duração da patologia após diagnóstico, verificou-se uma diminuição da expressão desta integrina no grupo de indivíduos com ES. Deste modo, e com significado estatístico, observa-se uma diminuição da sua expressão nos doentes com ES entre 1 a 10 anos.

Por outro lado, as células NK CD56<sup>bright</sup> apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de CD49e nos doentes com esta patologia à menos de um ano e nos que tinham a doença entre 1 a 10 anos (Figura 1).



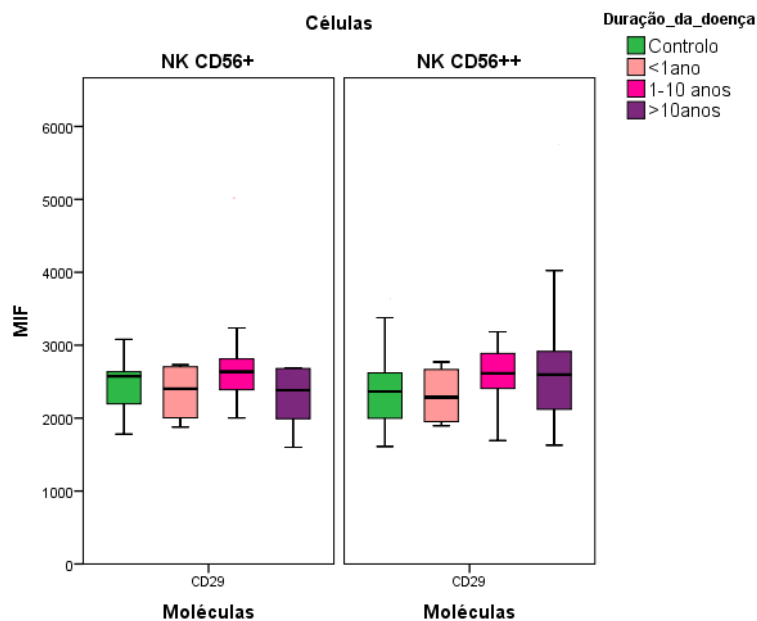
**Figura 1** – Expressão da Moléculas de Adesão (CD49e) nas 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) ao longo da doença. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF). As diferenças estatisticamente significativas  $p < 0,05$  são representadas por um \*.

Verificou-se de um modo geral um aumento da expressão de LAIR-1 em ambas as subpopulações de células NK à medida que a duração do tempo de doença aumenta (Figura 2).

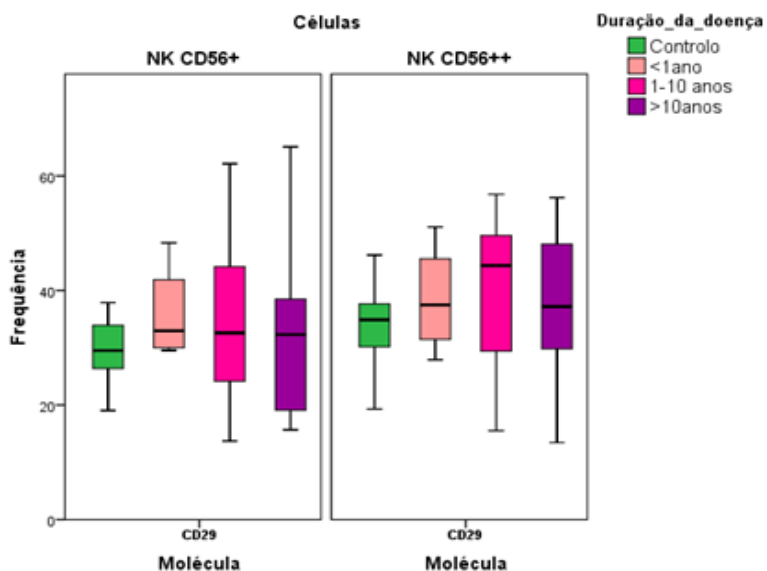


**Figura 2** – Expressão da Moléculas de Adesão (LAIR-1) nas 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) ao longo da doença. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF).

Ao longo da doença, podemos observar que não houve alterações significativas na expressão da molécula de adesão CD29, bem como da frequência de células a expressar esta proteína, em ambas as subpopulações de células NK (Figura 3 e 4).

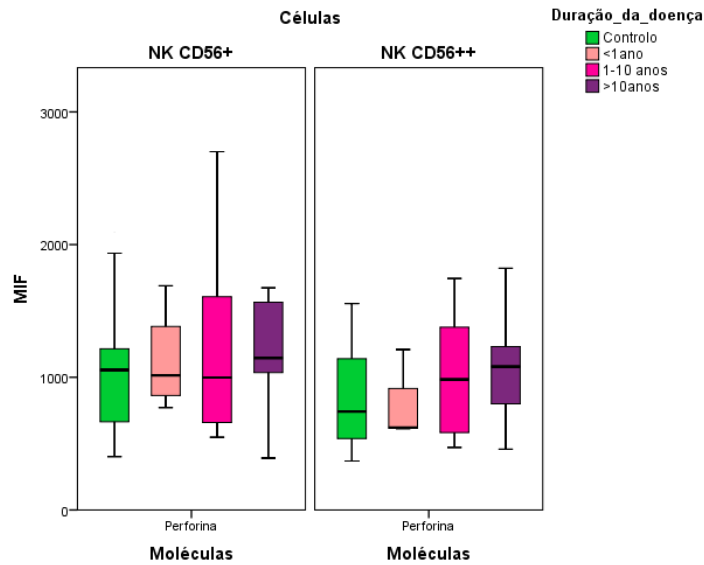


**Figura 3** – Expressão da Moléculas de Adesão (CD29) nas 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) ao longo da doença. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF).

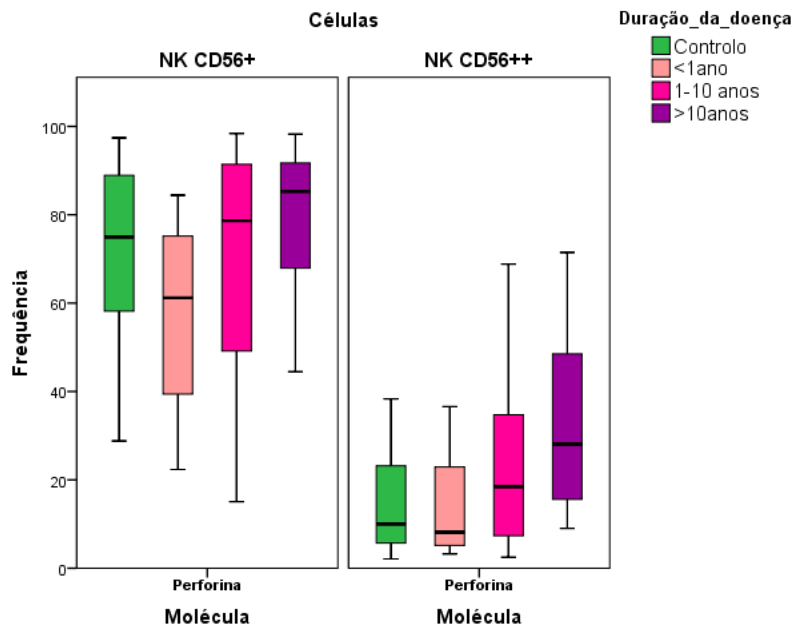


**Figura 4** – Expressão de CD29 nas 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>). Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK. Estas diferenças foram analisadas ao longo do tempo.

Ao longo da doença, podemos observar que não houve alterações significativas na frequência de células NK a expressar perforina, embora ocorra uma ligeira tendência para esta aumentar ao longo do tempo de duração da doença, bem como na expressão desta molécula citoplasmática (Figura 5 e 6).

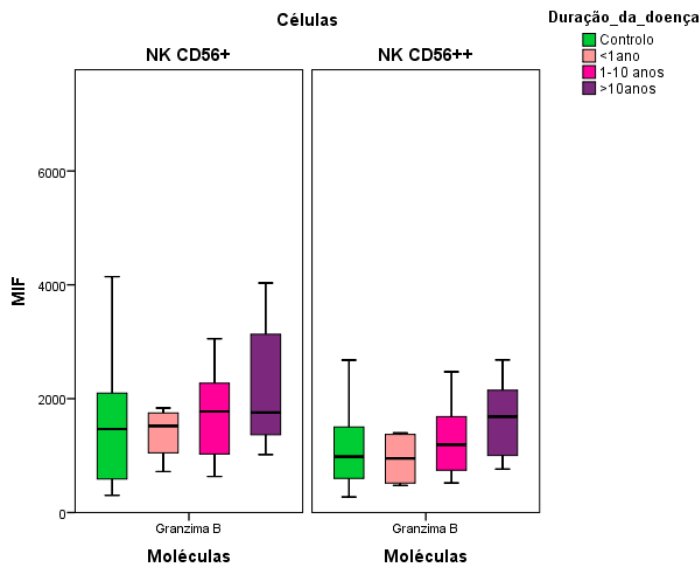


**Figura 5** - Expressão de perforina nas 2 subpopulações NK, NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup> ao longo da doença. Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF).

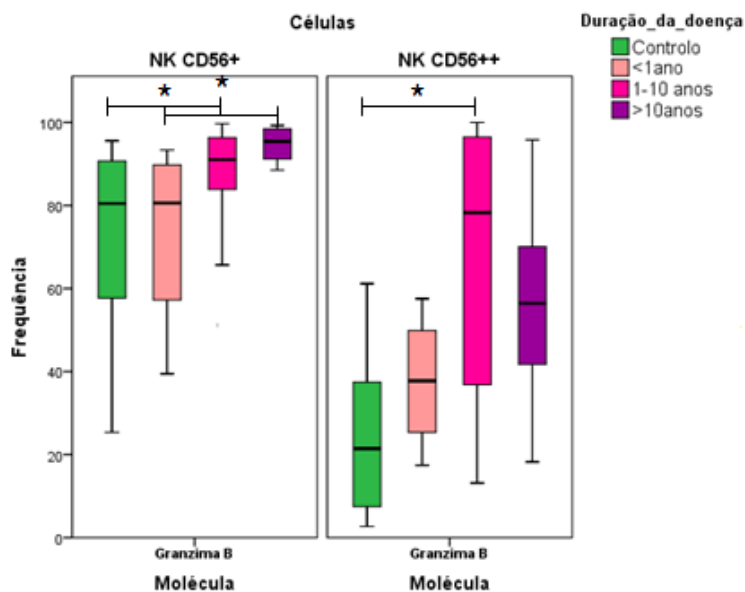


**Figura 6** – Frequência das 2 subpopulações NK, NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>, a expressar perforina. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK. Estas diferenças foram analisadas ao longo da doença.

Na avaliação da frequência de células NK a expressar granzima B, verificamos que ocorre um aumento da frequência das células NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup> a expressar esta proteína nos doentes com ES ao longo do tempo da doença. Não se observaram diferenças na expressão desta proteína em ambas as subpopulações de células NK (Figura 7 e 8).



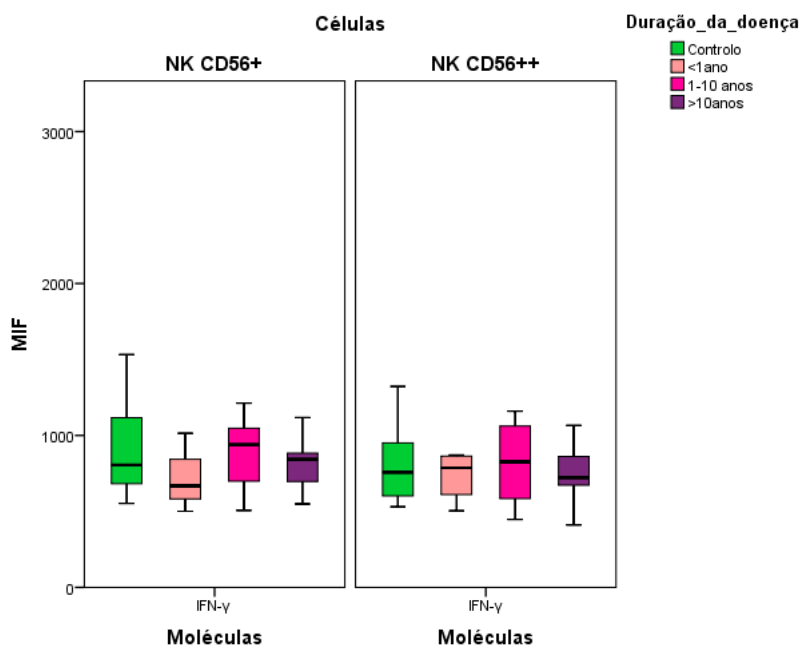
**Figura 7** - Expressão de granzima B nas 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF).



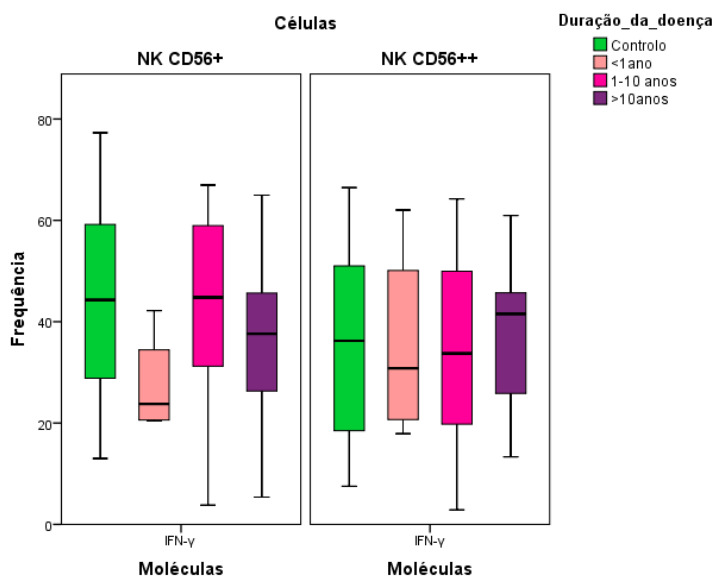
**Figura 8** – Frequência das 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) a expressar granzima B. Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK. Estas diferenças foram analisadas ao longo da doença.



Ao longo da doença, podemos observar que não houve alterações significativas na expressão de IFN- $\gamma$ , bem como da frequência de células a expressar esta proteína, em ambas as subpopulações de células NK (Figura 9 e 10).

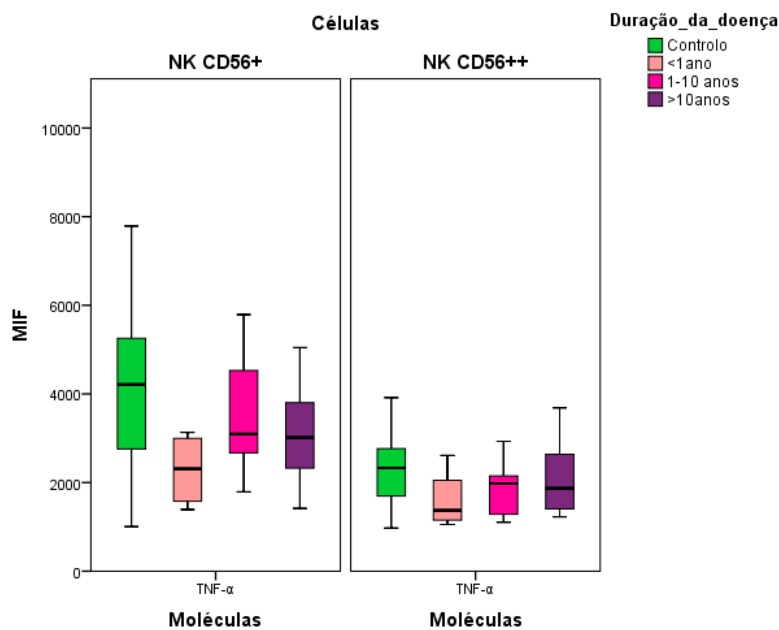


**Figura 9** – Expressão de IFN- $\gamma$  nas 2 subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF). Estas diferenças foram analisadas ao longo da doença.

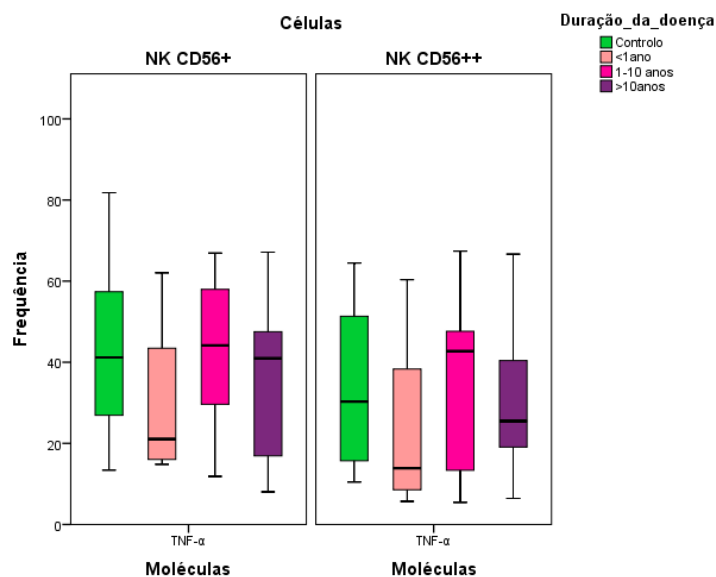


**Figura 10** - Frequência das 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) a expressar IFN- $\gamma$ . Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK. Estas diferenças foram analisadas ao longo da doença.

Ao longo da doença, podemos observar que não houve alterações significativas na expressão de TNF- $\alpha$ , bem como da frequência de células a expressar esta proteína, em ambas as subpopulações de células NK (Figura 11 e 12).



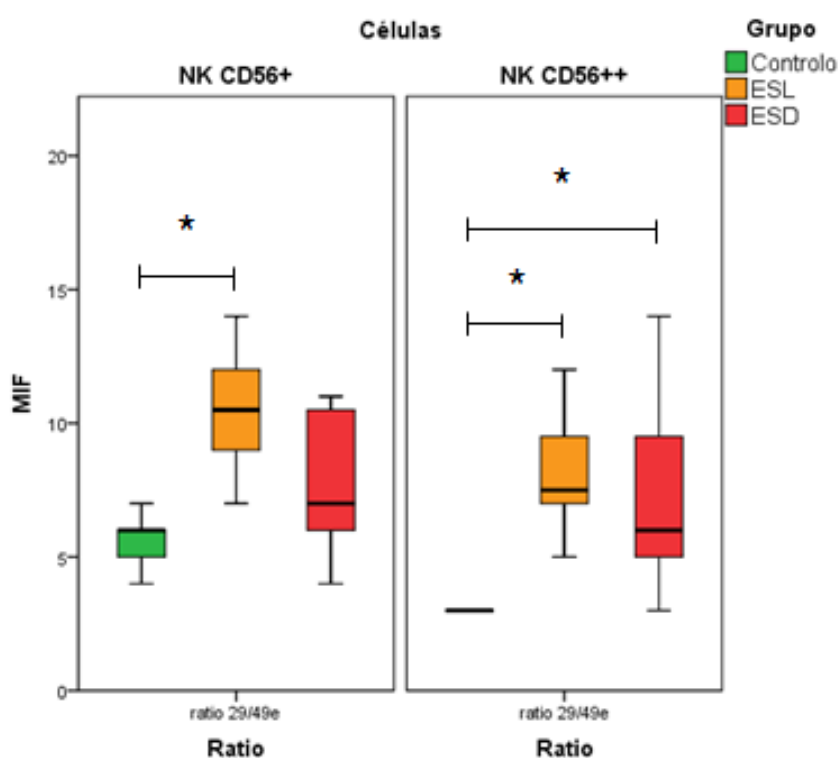
**Figura 11** - Expressão de TNF- $\alpha$  nas 2 subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF). Estas diferenças foram analisadas ao longo da doença.



**Figura 12** - Frequência das 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) a expressar TNF $\alpha$ . Os resultados estão expressos em Percentagem Celular (%) relativa ao total de células NK. Estas diferenças foram analisadas ao longo da doença.

**1.6. Ratio entre as duas integrinas CD29/CD49e nas duas subpopulações de células *Natural Killer*, *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural Killer* CD56<sup>bright</sup>, em doentes com Esclerose Sistémica difusa e limitada.**

Verificaram-se alterações no ratio entre as integrinas CD29 e CD49e nos subtipos de ES. Houve um aumento do ratio nas células NK CD56<sup>dim</sup> dos doentes com ESD relativamente ao grupo controlo. Já as células NK CD56<sup>bright</sup> apresentaram um aumento do ratio em ambos os subtipos da doença relativamente ao grupo controlo (Figura 13).



**Figura 13** – Ratio de CD29/CD49e nas 2 subpopulações NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>). Os resultados estão expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MIF).







## *Discussão dos Resultados*

---

A ES é uma patologia inflamatória auto-imune multisistémica. Uma das características centrais na ES é a presença de uma variedade de anomalias imunológicas que evidenciam mecanismos de desregulação que levam à evolução desta patologia. A rápida progressão desta patologia pode culminar na morte do doente, daí ser crucial entender os eventos que levam ao desenvolvimento da doença.(64)

Sabe-se que a desregulação imunológica, que ocorre nesta patologia, desempenha um papel importante na iniciação e desenvolvimento da doença. Adicionalmente, o aparecimento de infiltrados de células mononucleares na pele antes do aparecimento de alguma evidência de fibrose, indicia a actividade das células do sistema imune (SI) no estágio inicial da doença.(65, 66)

Curiosamente, estudos demonstraram que os fibroblastos de doentes com ES não apresentavam alterações no perfil genético, comprovando que a estimulação da síntese de colagénio é exógena e deste modo, a fase fibrótica poderá representar uma consequência da estimulação por células inflamatórias.

Neste contexto, torna-se importante conhecer qual o papel das células NK na inflamação crónica subjacente a esta patologia.

### **1. Quantificação das células *Natural Killer* totais, e das suas subpopulações *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural Killer* CD56<sup>bright</sup> do sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica**

As duas principais funções mediadas pelas células NK são a actividade citolítica e a produção de citocinas, funções estas normalmente atribuídas às células NK CD56<sup>dim</sup> e às células NK CD56<sup>bright</sup>, respectivamente. Efectivamente, ambas as subpopulações de células NK têm actividade citotóxica, embora as células NK CD56<sup>dim</sup>, sejam a subpopulação mais citotóxica, devido aos níveis mais elevados de perforinas e granzimas nos grânulos citolíticos. As NK CD56<sup>bright</sup> evidenciam também uma actividade citotóxica importante, no entanto, menos expressiva que as NK CD56<sup>dim</sup>.(67, 68)

Neste estudo, verificou-se que as células NK de um modo geral tendem a estar diminuídas no sangue periférico de doentes com ES em comparação a indivíduos saudáveis, no entanto só observamos valores estatisticamente significativos em doentes em que a severidade da doença era superior, como no caso da presença de FP e UD. Estes valores vão ao encontro de alguns estudos no âmbito desta e de outras doenças autoimunes (69) como é o caso do LES.(70, 71) Correlacionando a função



desempenhada por estas células, nomeadamente na resposta inflamatória, com o facto de se encontrarem particularmente diminuídas no SP neste grupo de doentes com FP e UD, sugere uma possível relação com a severidade da doença, podendo ser bons indicadores de lesão tecidual. De facto, as UD são lesões necróticas resultantes da manifestação vascular, que se acredita ocorrerem precocemente na fisiopatologia da ES, e deste modo é considerada na literatura como um dos marcadores da severidade da doença. Da mesma forma, a presença de FP traduz-se em morte tecidual e deste modo pode ser associada a um agravamento do estado clínico do doente. A diminuição da frequência das células NK na presença FP pode dever-se possivelmente à maior infiltração destas células nos tecidos lesados.(72)

Contudo, considerando a diferença registada entre as contagens de glóbulos brancos no SP entre os dois subtipos de ES, (Difuso =  $9,39 \pm 2,15 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{l}$  e Limitado =  $7,93 \pm 2,28 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{l}$ ), seria de esperar que a frequência das células em estudo se distinguisse com significância entre os dois subtipos da doença, o que não se verificou. O número reduzido de doentes com ES do subtipo difuso (apenas 10) em comparação com grupo de doentes com ES do subtipo limitado (30) pode estar na origem desta situação.

Os doentes foram também agrupados consoante a duração da doença considerando que um indivíduo que apresenta a doença há menos de 1 ano encontra-se num ambiente imunológico diferente do de um indivíduo que apresenta a doença há mais de 10 anos. Após análise estatística dos resultados, ao longo da duração da doença, não se verificaram valores estatisticamente significativos no entanto há tendências evidentes que se salientam. Deste modo o número de células NK total, quer em percentagem, quer em valor absoluto, em circulação tende a aumentar ao longo dos anos da doença, comportando-se as células NK CD56<sup>dim</sup> de igual forma e, por outro lado, as células NK CD 56<sup>bright</sup> apresentam uma diminuição com a duração da doença, embora em ambos os casos sem significado estatístico. Este facto pode ser explicado pelas células NK CD56<sup>bright</sup> serem a subpopulação predominante nas lesões inflamatórias, e com o evoluir da doença essas situações estarem aumentadas.(33)

O aparecimento de valores normais de células NK em doentes com ES diagnosticada há mais de 10 anos parece sugerir um envolvimento distinto das células NK no início e durante a duração da doença.

## **2. Caracterização fenotípica e funcional de células *Natural Killer* totais, *Natural Killer* CD56<sup>dim</sup> e *Natural Killer* CD56<sup>bright</sup> do sangue periférico de doentes com Esclerose Sistémica**

A expressão de integrinas está alterada em diversas condições patológicas. Na EM, a expressão endotelial da subunidade  $\beta 1$ , por exemplo, está reduzida durante a fase aguda da doença, mas depois retoma os níveis normais na fase crónica. Além disso, a inflamação estimula o aumento da expressão vascular das subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  e  $\beta 1$ .(73)

Os receptores dos componentes da matriz extracelular são predominantemente integrinas que os ligam ao citoesqueleto das células, transmitindo sinais e forças mecânicas permitindo a motilidade celular. Este processo é altamente regulado, dinâmico e requer remodelação contínua do citoesqueleto através da ligação célula-célula ou célula-componente da matriz extracelular.

A expressão da integrina CD49e, neste estudo, encontra-se diminuída em ambas as subpopulações de células NK em ES independentemente do subtipo de doença e da duração da doença. No entanto, esta diminuição parece ser mais acentuada em doentes com parâmetros clínicos de severidade da doença, como é o caso da presença de FP ou UD.

As integrinas controlam aspectos fundamentais no comportamento das células através da sua capacidade para realizar a transdução de sinal, bidireccionalmente, através da membrana celular. Esta transferência de informação é manifestada através de alterações conformacionais que traduzem a activação e o estado de afinidade de ligação da célula ao receptor.(74)

A fibronectina, é o ligando específico desta integrina, que na ES se encontra presente em excesso, na matriz extracelular do soro destes doentes.(75)

Por outro lado, a expressão de CD29 e a frequência das subpopulações de células NK, a expressar esta proteína, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos em estudo.

As células NK podem, ainda, exibir actividade pró-angiogénica na ES uma vez que nesta patologia ocorre a lesão vascular. Esta capacidade remodeladora é-lhes cedida através de moléculas de adesão como a E-caderina e pelas suas integrinas.(76)

As integrinas anteriores funcionam como agonistas no processo de inflamação crónica que ocorre na ES. No entanto, a célula NK desenvolve mecanismos de regulação negativos que têm como papel a regulação negativa da inflamação e reposição da homeostase celular.

O LAIR-1 surge assim como um receptor inibidor da activação celular expresso nas células NK, desempenhando um importante papel na regulação do SI. (77) Neste estudo, o LAIR-1 evidenciou uma tendência de aumento da sua expressão em ambas as subpopulações de células NK mostrando esse aumento, significância estatística em ambas as subpopulações, em ESL.

Mediante acoplamento da porção extracelular de LAIR-1, os ITIM ligam-se ao domínio SH2 das fosfatases, conduzindo à inactivação de diferentes cinases sub-regulando, assim, a activação da célula NK. Estudos evidenciam que, para além de inibir a activação das células NK, o LAIR-1 inibe, também, as células T.

Os colagénios, presentes em concentrações elevadas no soro de pacientes com ES, são ligandos funcionais deste receptor, inibindo esta interacção, a activação de células imunes.(60)

A ligação do colagénio ao LAIR-1 nas células NK fornece um potente sinal inibidor que é capaz de impedir a lise das células alvo, através da inactivação das células NK activadas, reduzindo a sua citotoxicidade. A identificação dos colagénios como os ligandos de LAIR-1 evidencia um papel de relevo para os componentes da matriz extracelular como potenciais proteínas reguladoras do sistema imune. A interacção do LAIR-1 com os colagénios é de alta afinidade e dependente da presença de hidroxiprolina, com modificação pós-translacional que está exclusivamente presente nas repetições *Gly-Pro-Hyp* do colagénio.

O aumento de glicoproteínas citolíticas na ES é um dos mecanismos esperado visto a perforina ter como missão a formação de poros, nas membranas das células alvo, permitindo a entrada de granzimas resultando na morte celular por apoptose.(78)

De uma forma geral observou-se um aumento da frequência de células NK a expressar quer granzima B quer perforina, bem como da expressão destas proteínas em ES. Este facto evidencia uma maior actividade citotóxica nas células dos doentes. Este aumento parece ser mais evidente nos doentes com parâmetros clínicos de severidade de doença, como a FP e UD e ao longo da doença. Aumentos de granzima B solúvel tem sido, também, observado durante a inflamação prolongada e é implicado na patogénese de doenças inflamatórias crónicas como é o caso da ES.(79)

A granzima B é produzida por células com capacidade citotóxica, como é o caso da célula NK, e a sua libertação promove apoptose da célula infectada ou de células tumorais.(80)

A capacidade citotóxica das células NK está assim aumentada evidenciando um processo contínuo de inflamação crónica.

As células NK são também conhecidas pela sua função citotóxica, sendo esta, essencial na resposta contra tumores, vírus intracelulares e na imuno vigilância, de um modo geral. As IL-2 e IL-15 são responsáveis por sinais importantes que levam à proliferação, sobrevivência e activação citolítica das células NK. A actividade das células NK é controlada por um equilíbrio entre estimulação e inibição de receptores de superfície, sendo os receptores inibitórios responsáveis pela tolerância das células NK a antígenos do próprio. A produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , pelas células NK, está funcionalmente ligada à sua actividade citolítica. As células NK CD56<sup>dim</sup> representam uma subpopulação única que combina a capacidade de produção de IFN- $\gamma$  após serem estimuladas e proliferarem com a capacidade de matar células e produzir citocinas após a recepção de sinais de activação. A capacidade destas citocinas inflamatórias para induzir sinergicamente a citólise de células alvo, demonstrando assim, que são parte integrante da função efectora das células NK.(81)

O IFN- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória com actividade anti-angiogénica que intervém em várias patologias inflamatórias como é o caso da AR, do LES e da ES.(82) O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina inflamatória que também intervém na angiogenese. (82) A principal função do TNF- $\alpha$  na ES é o bloqueio do colagénio, controlando assim a fibrose. Há evidências que mostram que níveis de TNF- $\alpha$  têm sido detectados na pele de doentes com ES na fase inicial da doença.(83)

Neste estudo não observamos alterações significativas para estas duas citocinas. Segundo a literatura, aumentos de TNF- $\alpha$  no soro encontram-se descritos em doentes com ES e são normalmente associados à fisiopatologia da doença, nomeadamente na inflamação e fibrose, pela estimulação da produção de colagénio.

Estudos anteriores revelam, ainda, que um aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  está associado a doentes com ES com um quadro clínico estável, enquanto que, os doentes com doença activa tendem a apresentar níveis de IFN- $\gamma$  semelhantes aos indivíduos saudáveis.(84). No caso do IFN- $\gamma$  o seu controlo terapêutico torna-se importante nestes doentes uma vez que esta citocina tende a agravar significativamente a sua função pulmonar, bem como a deterioração da pele, fenómeno frequente nesta patologia.(85)



## *Conclusão*

---

Os nossos resultados sugerem uma diminuição da percentagem e valor absoluto de células NK totais e suas subpopulações, NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>, em doentes com ES, sobretudo na presença de UD e FP.

Observamos uma diminuição da expressão de CD49e e o aumento da expressão de LAIR-1 nas células NK em doentes com ES, principalmente na presença dos parâmetros clínicos referidos em doentes com ES, que poderá corresponder a alterações na capacidade de migração destas células, principalmente, mediado pelos componentes da matriz extracelular, como a fibronectina e o colagénio.

Verificamos um aumento da frequência de células NK a expressar granzima B e perforina, bem como um aumento da expressão destas duas proteínas, evidenciando uma maior capacidade citotóxica destas células, provavelmente devido a um maior limiar de activação periférica.

Deste modo, julgamos ter demonstrado que as células NK parecem ter um papel importante na fisiopatologia da ES, pelas alterações fenotípicas e funcionais detectadas neste estudo, podendo vir a ser aplicadas na monitorização da severidade desta doença debilitante, no futuro.

## *Referências Bibliográficas*

---



1. Castro SV, Jimenez SA. Biomarkers in systemic sclerosis. *Biomark Med.* 2010 Feb;4(1):133-47.
2. Hausteil UF. Systemic sclerosis-scleroderma. *Dermatol Online J.* 2002 Jun;8(1):3.
3. Vitiello M, Abuchar A, Santana N, Dehesa L, Kerdel FA. An Update on the Treatment of the Cutaneous Manifestations of Systemic Sclerosis: The Dermatologist's Point of View. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2012 Jul;5(7):33-43.
4. Frech T, Hatton N, Markewitz B, Scholand MB, Cawthon R, Patel A, et al. The vascular microenvironment and systemic sclerosis. *Int J Rheumatol.* 2010;2010.
5. Mura G, Bhat KM, Pisano A, Licci G, Carta M. Psychiatric symptoms and quality of life in systemic sclerosis. *Clin Pract Epidemiol Ment Health.* 2012;8:30-5.
6. Chabaud S, Moulin VJ. Apoptosis modulation as a promising target for treatment of systemic sclerosis. *Int J Rheumatol.* 2011;2011:495792.
7. Dar SA, Bhattacharya SN, Das S, Ramachandran VG, Banerjee BD, Arora P. Response of T-cell subpopulations to superantigen and recall antigen stimulation in systemic sclerosis. *Indian J Dermatol.* 2012 May;57(3):175-80.
8. Gorlova O, Martin JE, Rueda B, Koeleman BP, Ying J, Teruel M, et al. Identification of novel genetic markers associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis through a genome-wide association strategy. *PLoS Genet.* 2011 Jul;7(7):e1002178.
9. Mota J, Castellano A, Santiago F, Carvalho P, Madeira AS, Pereira De Moura JM, et al. [Digital ulcers in systemic sclerosis: use of endotheline antagonists]. *Acta Med Port.* 2011 Sep-Oct;24(5):837-42.
10. Van Praet JT, Smith V, Haspelslagh M, Degryse N, Elewaut D, De Keyser F. Histopathological cutaneous alterations in systemic sclerosis: a clinicopathological study. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(1):R35.
11. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jun;66(6):754-63.
12. Khanna D, Denton CP. Evidence-based management of rapidly progressing systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010 Jun;24(3):387-400.
13. Nitsche A. Raynaud, digital ulcers and calcinosis in scleroderma. *Reumatol Clin.* 2012 Jul 24.

14. Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood*. 1999 Mar 15;93(6):2033-7.
15. Zuber JP, Spertini F. Immunological basis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Oct;45 Suppl 3:iii23-5.
16. van Hal TW, van Bon L, Radstake TR. A system out of breath: how hypoxia possibly contributes to the pathogenesis of systemic sclerosis. *Int J Rheumatol*. 2011;2011:824972.
17. Chung L, Distler O, Hummers L, Krishnan E, Steen V. Vascular disease in systemic sclerosis. *Int J Rheumatol*. 2010;2010:714172.
18. Rabquer BJ, Hou Y, Del Galdo F, Kenneth Haines G, 3rd, Gerber ML, Jimenez SA, et al. The proadhesive phenotype of systemic sclerosis skin promotes myeloid cell adhesion via ICAM-1 and VCAM-1. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Jul;48(7):734-40.
19. Bussone G, Dib H, Tamby MC, Broussard C, Federici C, Woimant G, et al. Identification of new autoantibody specificities directed at proteins involved in the transforming growth factor beta pathway in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(3):R74.
20. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):823-35.
21. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite AE. Vascular involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *J Inflamm Res*. 2011;4:105-25.
22. Smith GP, Chan ES. Molecular pathogenesis of skin fibrosis: insight from animal models. *Curr Rheumatol Rep*. 2010 Feb;12(1):26-33.
23. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, et al. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One*. 2009;4(6):e5981.
24. Katsumoto TR, Violette SM, Sheppard D. Blocking TGFbeta via Inhibition of the alphavbeta6 Integrin: A Possible Therapy for Systemic Sclerosis Interstitial Lung Disease. *Int J Rheumatol*. 2011;2011:208219.
25. Arefiev K, Fiorentino DF, Chung L. Endothelin Receptor Antagonists for the Treatment of Raynaud's Phenomenon and Digital Ulcers in Systemic Sclerosis. *Int J Rheumatol*. 2011;2011:201787.

26. Daoussis D, Liossis SN, Yiannopoulos G, Andonopoulos AP. B-cell depletion therapy in systemic sclerosis: experimental rationale and update on clinical evidence. *Int J Rheumatol.* 2011;2011:214013.
27. Horikawa M, Hasegawa M, Komura K, Hayakawa I, Yanaba K, Matsushita T, et al. Abnormal natural killer cell function in systemic sclerosis: altered cytokine production and defective killing activity. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct;125(4):731-7.
28. Odom CI, Gaston DC, Markert JM, Cassady KA. Human herpesviridae methods of natural killer cell evasion. *Adv Virol.* 2012;2012:359869.
29. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008 Aug 1;112(3):461-9.
30. Agudelo O, Bueno J, Villa A, Maestre A. High IFN-gamma and TNF production by peripheral NK cells of Colombian patients with different clinical presentation of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2012;11:38.
31. Okuno Y, Tatetsu H, Nosaka K, Mitsuya H. Three cases of aggressive natural killer cell leukemia with a lethal hemorrhagic complication. *J Clin Exp Hematop.* 2012;52(2):101-6.
32. Hong HS, Ahmad F, Eberhard JM, Bhatnagar N, Bollmann BA, Keudel P, et al. Loss of CCR7 Expression on CD56(bright) NK Cells Is Associated with a CD56(dim)CD16(+) NK Cell-Like Phenotype and Correlates with HIV Viral Load. *PLoS One.* 2012;7(9):e44820.
33. Sentman CL, Meadows SK, Wira CR, Eriksson M. Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J Immunol.* 2004 Dec 1;173(11):6760-6.
34. Kim TD, Lee SU, Yun S, Sun HN, Lee SH, Kim JW, et al. Human microRNA-27a\* targets Prf1 and GzmB expression to regulate NK-cell cytotoxicity. *Blood.* 2011 Nov 17;118(20):5476-86.
35. Lang PA, Lang KS, Xu HC, Grusdat M, Parish IA, Recher M, et al. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 24;109(4):1210-5.
36. Regner M, Pavlinovic L, Young N, Mullbacher A. In vivo elimination of MHC-I-deficient lymphocytes by activated natural killer cells is independent of granzymes A and B. *PLoS One.* 2011;6(8):e23252.
37. Thiery J, Keefe D, Boulant S, Boucrot E, Walch M, Martinvalet D, et al. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol.* 2011 Aug;12(8):770-7.

38. Jeong WI, Park O, Suh YG, Byun JS, Park SY, Choi E, et al. Suppression of innate immunity (natural killer cell/interferon-gamma) in the advanced stages of liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2011 Apr;53(4):1342-51.
39. Farina GA, York MR, Di Marzio M, Collins CA, Meller S, Homey B, et al. Poly(I:C) drives type I IFN- and TGFbeta-mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*. 2010 Nov;130(11):2583-93.
40. Du X, Wu J, Zhang M, Gao Y, Zhang D, Hou M, et al. Upregulated expression of cytotoxicity-related genes in IFN-gamma knockout mice with *Schistosoma japonicum* infection. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:864945.
41. Badea I, Taylor M, Rosenberg A, Foldvari M. Pathogenesis and therapeutic approaches for improved topical treatment in localized scleroderma and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Mar;48(3):213-21.
42. Han L, Song JH, Yoon JH, Park YG, Lee SW, Choi YJ, et al. TNF-alpha and TNF-beta Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Osteoarthritis in a Korean Population. *Korean J Pathol*. 2012 Feb;46(1):30-7.
43. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards CK, 3rd, Roux-Lombard P, et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2381-9.
44. Yamane K, Ihn H, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K. Antagonistic effects of TNF-alpha on TGF-beta signaling through down-regulation of TGF-beta receptor type II in human dermal fibroblasts. *J Immunol*. 2003 Oct 1;171(7):3855-62.
45. Pantelidis P, McGrath DS, Southcott AM, Black CM, du Bois RM. Tumour necrosis factor-alpha production in fibrosing alveolitis is macrophage subset specific. *Respir Res*. 2001;2(6):365-72.
46. Whiteside TL, Herberman RB. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994 Mar;1(2):125-33.
47. Sedlmayr P, Schallhammer L, Hammer A, Wilders-Truschnig M, Wintersteiger R, Dohr G. Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996 Aug;110(4):308-13.
48. Nagae M, Re S, Mihara E, Nogi T, Sugita Y, Takagi J. Crystal structure of alpha5beta1 integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor. *J Cell Biol*. 2012 Apr 2;197(1):131-40.

49. Li G, Zhang L, Chen E, Wang J, Jiang X, Chen JH, et al. Dual functional monoclonal antibody PF-04605412 targets integrin alpha5beta1 and elicits potent antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* 2010 Dec 15;70(24):10243-54.
50. Deng B, Zhang S, Miao Y, Han Z, Zhang X, Wen F, et al. Adrenomedullin expression in epithelial ovarian cancers and promotes HO8910 cell migration associated with upregulating integrin alpha5beta1 and phosphorylating FAK and paxillin. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31:19.
51. Tiwari A, Jung JJ, Inamdar SM, Brown CO, Goel A, Choudhury A. Endothelial cell migration on fibronectin is regulated by syntaxin 6-mediated alpha5beta1 integrin recycling. *J Biol Chem.* 2011 Oct 21;286(42):36749-61.
52. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology.* 2009 Apr;126(4):458-65.
53. Bendall LJ, Kortlepel K, Bradstock KF, Gottlieb DJ. Natural killer cells adhere to bone marrow fibroblasts and inhibit adhesion of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 1995 Jun;9(6):999-1005.
54. Meves A, Geiger T, Zanivan S, DiGiovanni J, Mann M, Fassler R. Beta1 integrin cytoplasmic tyrosines promote skin tumorigenesis independent of their phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 13;108(37):15213-8.
55. Aljamal-Naylor R, Wilson L, McIntyre S, Rossi F, Harrison B, Marsden M, et al. Allosteric modulation of beta1 integrin function induces lung tissue repair. *Adv Pharmacol Sci.* 2012;2012:768720.
56. Liu S, Kapoor M, Denton CP, Abraham DJ, Leask A. Loss of beta1 integrin in mouse fibroblasts results in resistance to skin scleroderma in a mouse model. *Arthritis Rheum.* 2009 Sep;60(9):2817-21.
57. Omiya R, Tsushima F, Narazaki H, Sakoda Y, Kuramasu A, Kim Y, et al. Leucocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 is an inhibitory regulator of contact hypersensitivity. *Immunology.* 2009 Dec;128(4):543-55.
58. Brondijk TH, de Ruiter T, Ballering J, Wienk H, Lebbink RJ, van Ingen H, et al. Crystal structure and collagen-binding site of immune inhibitory receptor LAIR-1: unexpected implications for collagen binding by platelet receptor GPVI. *Blood.* 2010 Feb 18;115(7):1364-73.
59. Meyaard L, Hurenkamp J, Clevers H, Lanier LL, Phillips JH. Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 functions as an inhibitory receptor on cytotoxic T cells. *J Immunol.* 1999 May 15;162(10):5800-4.

60. Colombo BM, Canevali P, Magnani O, Rossi E, Puppo F, Zocchi MR, et al. Defective expression and function of the leukocyte associated Ig-like receptor 1 in B lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients. *PLoS One*. 2012;7(2):e31903.
61. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1980 May;23(5):581-90.
62. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988 Feb;15(2):202-5.
63. Corriveau MP, Boufaied I, Lessard J, Chabaud S, Senecal JL, Grodzicky T, et al. The fibrotic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts varies with disease duration and severity of skin involvement: reconstitution of skin fibrosis development using a tissue engineering approach. *The Journal of pathology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Mar;217(4):534-42.
64. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:509-37.
65. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol*. 1992 Mar;166(3):255-63.
66. Valentini G, Vettori S, Cuomo G, Iudici M, D'Abrosca V, Capocotta D, et al. Early systemic sclerosis: short-term disease evolution and factors predicting the development of new manifestations of organ involvement. *Arthritis Res Ther*. 2012 Aug 17;14(4):R188.
67. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 11;108(2):728-32.
68. Nielsen N, Odum N, Urso B, Lanier LL, Spee P. Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A. *PLoS One*. 2012;7(2):e31959.
69. Akesson C, Uvebrant K, Oderup C, Lynch K, Harris RA, Lernmark A, et al. Altered natural killer (NK) cell frequency and phenotype in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) prior to insulin deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jul 1;161(1):48-56.
70. Hagberg N, Berggren O, Leonard D, Weber G, Bryceson YT, Alm GV, et al. IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune

complexes is promoted by NK cells via MIP-1beta and LFA-1. *J Immunol.* 2011 May 1;186(9):5085-94.

71. Schepis D, Gunnarsson I, Eloranta ML, Lampa J, Jacobson SH, Karre K, et al. Increased proportion of CD56bright natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus. *Immunology.* 2009 Jan;126(1):140-6.

72. Fernandez-Flores A, Rodriguez-Prado N. An ulcerated lesion due to HSV-2 infection with a CD56+ cell predominant inflammatory infiltrate. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2011;20(4):201-5.

73. Milner R, Campbell IL. Increased expression of the beta4 and alpha5 integrin subunits in cerebral blood vessels of transgenic mice chronically producing the pro-inflammatory cytokines IL-6 or IFN-alpha in the central nervous system. *Mol Cell Neurosci.* 2006 Dec;33(4):429-40.

74. Askari JA, Tynan CJ, Webb SE, Martin-Fernandez ML, Ballestrem C, Humphries MJ. Focal adhesions are sites of integrin extension. *J Cell Biol.* 2010 Mar 22;188(6):891-903.

75. Chen L, Vicente-Manzanares M, Potvin-Trottier L, Wiseman PW, Horwitz AR. The integrin-ligand interaction regulates adhesion and migration through a molecular clutch. *PLoS One.* 2012;7(7):e40202.

76. Bouchentouf M, Forner KA, Cuerquis J, Michaud V, Zheng J, Paradis P, et al. Induction of cardiac angiogenesis requires killer cell lectin-like receptor 1 and alpha4beta7 integrin expression by NK cells. *J Immunol.* 2010 Dec 1;185(11):7014-25.

77. van der Vuurst de Vries AR, Clevers H, Logtenberg T, Meyaard L. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *Eur J Immunol.* 1999 Oct;29(10):3160-7.

78. Camina-Tato M, Morcillo-Suarez C, Bustamante MF, Ortega I, Navarro A, Muntasell A, et al. Gender-associated differences of perforin polymorphisms in the susceptibility to multiple sclerosis. *J Immunol.* 2010 Nov 1;185(9):5392-404.

79. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med.* 2012 Oct 22.

80. Trapani JA. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):21-7.

81. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol.* 2012 Feb;91(2):299-309.

82. Zielonka TM, Demkow U, Puscinska E, Golian-Geremek A, Filewska M, Zycinska K, et al. TNFalpha and INFgamma inducing capacity of sera from patients with interstitial lung disease in relation to its angiogenesis activity. *J Physiol Pharmacol.* 2007 Nov;58 Suppl 5(Pt 2):767-80.
83. Young V, Ho M, Vosper H, Belch JJ, Palmer CN. Elevated expression of the genes encoding TNF-alpha and thromboxane synthase in leucocytes from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2002 Aug;41(8):869-75.
84. Molteni M, Della Bella S, Mascagni B, Bazzi S, Zulian C, Compasso S, et al. Increased interferon-gamma (IFN-gamma) levels produced in vitro by alloactivated T lymphocytes in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *Clin Exp Immunol.* 1999 Apr;116(1):164-8.
85. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):589-98.