

11262
2 ej 3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"Salvador Zubirán"

FACTOR DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE LINFOCITOS B,
POR SU VIA AUTOCRINA, EN LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

TRABAJO DE TESIS DE POSTGRADO
Que para obtener el título Universitario de:
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
Reumatología - Inmunología
presenta:
LAURA DE LOURDES CANO LOPEZ DE NAVA

México, D.F. ENERO de 1989.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	HOJA
Introducción.....	1
Objetivo.....	4
Hipótesis.....	5
Material y Métodos.....	6
Resultados.....	11
Discusion.....	26
Bibliografía.....	31

FACTOR DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE LINFOCITOS B, POR SU VIA AUTOCRINA, EN LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

INTRODUCCION

El lupus eritematoso generalizado se caracteriza por varias alteraciones inmunológicas, debidas a una pérdida general de regulación de la respuesta inmune y que incluye tanto a los linfocitos T como a los B (Jasin & Ziff, 1975; Alarcón-Segovia y cols. 1985).

La hiperactividad de las células B es un hallazgo común, manifestándose por la presencia de hipergamaglobulinemia y múltiples autoanticuerpos (Estes & Christian, 1971; -- Decker y cols. 1975; Decker y cols. 1979; Alarcón-Segovia y cols. 1982). Esta hiperactividad de las células B puede explicarse por: a) defectos en las células T supresoras que no controlan la actividad de las células B, b) a la función excesiva de las células T de ayuda, y c) a la respuesta aumentada de las células B a los factores de crecimiento y diferenciación (Ruiz-Arguelles y cols. 1980; Hirose y cols. 1985).

El paso de las células B de su estado de reposo a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas implica activación, proliferación y diferenciación. Las células B pue

den ser activadas en forma independiente de las células T, sin llegar a diferenciarse, con el mitógeno SAC -esta filococo dorado cowan 1- (Falkoff y cols. 1982; Sawada y cols. 1985), y posteriormente se suma la acción de numerosos factores producidos por las células T, B y accesorias que participan en el crecimiento y diferenciación de la célula B, entre los cuales se incluye el factor estimulador de células B - 1 (BSF1 o IL-4), el factor de crecimiento de células B - II (BCGF II o IL-5), el factor - estimulador de células B - 2 (BSF2 o IL-6), la IL-2 e IL-1, entre otras (Noma y cols. 1986; Lee y cols. 1986; Kinashi y cols. 1986; Hirano y cols. 1986).

Los linfocitos B de los pacientes con lupus eritematoso - generalizado, responden en forma diferente que las células de individuos normales a la señal exógena de dichos - factores; Martínez-Cordero y cols. (1986) observaron una respuesta proliferativa mayor de las células B de pacientes con lupus al factor de crecimiento de células B y a la IL-1 , al compararla con la respuesta de células normales.

Aunque se tiene una mejor idea del papel de las linfocinas derivadas de las células T y accesorias en la respuesta proliferativa y de diferenciación de las células B (- Kishimoto & Hirano, 1988), poco se ha estudiado la fun--

ción de los factores solubles producidos por las células B . Jurgensen, Ambrus & Fauci (1986) demostraron que las células B normales son capaces de producir su propio factor de crecimiento.

OBJETIVO

El factor de crecimiento y diferenciación de las células B deriva principalmente de las células T y activa a las células B a proliferar y diferenciarse. En este estudio nosotros buscamos la producción de ambos factores por células B, es decir, una vía autócrina, en personas normales y en pacientes con lupus eritematoso generalizado, - así como la respuesta de las células B a estas linfocinas.

HIPOTESIS

Los linfocitos B en sangre periférica de pacientes con - lupus eritematoso generalizado están activados y predife-
renciados en vivo. Siendo así, estas células son capa-
ces de producir sus propios factores de crecimiento y --
diferenciación.

Estos factores pueden tener efectos de crecimiento y di-
ferenciación sobre células B normales.

MATERIAL Y METODOS

SUJETOS: Estudiamos 33 pacientes, de sexo femenino, con edades comprendidas entre los 15 y 35 años, que llenaron los criterios para el diagnóstico de lupus eritematoso - generalizado (Tan y cols. 1982), 18 con actividad clínica y/o serológica de su padecimiento, incluyendo pacientes con manifestaciones neuropsiquiátricas, dermatológicas, - hematológicas, serositis, artritis y/o captación de DNA aumentada, complemento bajo, trombocitopenia, linfopenia (Urowitz y cols. 1984; Liang y cols. 1988), y 15 pacientes no activos, en remisión por períodos de 1 a 8 años, los 33 pacientes no recibieron tratamiento con corticoesteroides o inmunosupresores por lo menos un mes antes del estudio.

CONTROLES: Doce personas, voluntarias sanas, del mismo sexo y en los mismos límites de edad que los pacientes.

CELULAS: Se extrajeron de pacientes y controles 40 a 60 cc de sangre venosa; las células mononucleares las obtuvimos mediante gradientes de Ficoll-Hipaque, lavadas tres - veces en solución salina amortiguadora de fosfato a pH de 7.4. Los monocitos los separamos por su adherencia al -- plástico, incubados por 18 hs. a 37°C. Las células T y B se aislaron por "roseteo" con eritrocitos de carnero, -Las células mononucleares más eritrocitos de carnero y suero fetal se centrifugaron e incubaron por 18 hs a 4°C,

después, por gradiente de Ficoll-Hipaque se separaron las células B de las T (Alcocer-Varela & Alarcón Segovia, -- 1982). Las células B se purificaron aun más con tratamiento con anticuerpo anti-CD3 y complemento (Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ), el 95% de las células B purificadas tenían inmunoglobulina en su superficie, - por análisis citométrico de flujo en un citofluorógrafo - Ortho FC 200 (Melendro y cols. 1983).

CULTIVO CELULAR: Todos los cultivos se hicieron en medio RPMI-1640, suplementado con penicilina 100 UI/cc, estreptomycinina 100 mg/cc, glutamina 2mM y 5% de suero fetal de ternera (medio completo), en placas de microcultivo a 37°C., en una atmósfera con CO2 al 5% y humedad al 100%.

PRODUCCION DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE LA CELULA B: Los linfocitos B de pacientes y controles - se incubaron en el medio completo (2×10^6 células por cc), durante 24 hs. El sobrenadante (SN) se obtuvo mediante - centrifugación y se probó sobre células B de pacientes, - de controles y células SKW-CL4 (ver más adelante).

ENSAYO DE CRECIMIENTO DE CELULAS B: Las células B (2×10^6 células/cc) de 10 pacientes con LEG activo, 10 pacientes con lupus no activo y 10 controles sanos, se colocaron en cajas de microcultivo y se estimularon con SAC 1:4000 (v/v), durante 3 días, posteriormente se agregaron los SN a estudiar de pacientes y controles (dilución 1:2) o medio completo, como basal, en la misma dilución 1:2, por 3

días más, al término de los cuales se les añadió timidina (H^3) 0.5 μ Ci, y se midió su incorporación en un espectrómetro de centelleo líquido (Packard).

El efecto del sobrenadante de las células B se cuantificó mediante un índice de estimulación, extraído del promedio de las cuentas por minuto (cpm) de captación de T(H)3, hechas por triplicado para cada sujeto, con los diferentes SN, dividido entre el promedio de las cpm basales (SN de cultivo de células B preactivadas, sin la adición de ningún factor), todo esto menos uno.

ENSAYO DE DIFERENCIACION DE CELULAS B: Para la diferenciación celular las células B de 20 pacientes (10 activos y 10 no activos) y 10 controles, en reposo o estimuladas con SAC, como ya se mencionó en el experimento anterior, se probaron con los diferentes sobrenadantes o con medio completo durante 3 días, se colectó su sobrenadante y se midió la cantidad de IgG e IgM por el método de ELISA. La cantidad de IgG e IgM producida por las células B de pacientes y controles en ausencia de factores de estimulación se restó a la producción de IgG e IgM respectivamente producida por las células B en presencia de los SNs a probar.

METODO DE ELISA: En microplacas de 96 pozos (Nunc Intermed, Kamstrup, Denmark) se colocaron 100 μ l del fragmento F(ab)2 de anti-IgG o IgM de cabra, a una concentración de 10 μ g/ml en solución amortiguadora de carbonato (pH: 9.6)

y se incubaron 18 hs. a 4°C., entonces cada pozo se lavó tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (pH: 7.4) con Tween-20 al 0.05% (PBS-Tween), en cada pozo se colocó 100 µl de albúmina humana por una hora a 37°C., se lavó y se pusieron 100 µl de los diferentes sobrenadantes a probar, se incubó una hora a 37°C, se lavó en 3 -- ocasiones y se le agregó 100 µl de anti-Ig humana marcada con fosfatasa alcalina 1:1500 en PBS-Tween por una hora a 37°C, de nuevo se lavó y se añadió el sustrato enzimático (p-nitrofenil/fosfato), a los 30 minutos se paró la reacción con H2SO4 y se midió su absorbancia, la cantidad de Ig se calculó en una curva estándar (curva estándar por placa de ensayo) (Hirose y cols. 1985).

LINEA CELULAR: La presencia de factor de diferenciación de células B se puede demostrar mediante la utilización de células B SKW-CL4, línea celular blastoide B humana, que expresa moléculas de IgM en su superficie (Saiki & - Ralph, 1983), ya que estas células responden secretando IgM, únicamente en presencia de dicho factor, sin requerir de división celular previa (Kikutani y cols. 1985). La actividad del factor de diferenciación de células B se detectó al incubar diez mil células SKW-CL4 en 0.2 cc de medio completo con los diferentes sobrenadantes (v/v), de 18 pacientes con LEG activo, 15 pacientes con lupus no activo y de 12 controles normales, por 3 días, se separó

su sobrenadante y se midió su contenido de IgM por el método de ELISA.

ANALISIS ESTADISTICO: Los resultados se analizaron para su significado estadístico por la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (de dos colas).

R E S U L T A D O S

EFFECTO DEL SN OBTENIDO DE CELULAS B NORMALES: Al probar este sobrenadante sobre células B normales se observó un efecto inhibitorio de su proliferación (índice de estimulación (IE) \pm error estándar (EE)= -0.168 ± 0.153) y al contrario, este mismo SN indujo respuesta proliferativa - tanto en las células B de pacientes con LEG activo (IE= -0.979 ± 0.337) como de lupus inactivo (IE= 0.211 ± 0.211); la diferencia entre la respuesta de las células B normales y las células de pacientes con LEG activo fué significativa ($p= 0.02$) (ver tabla 1 y gráfica 1).

EFFECTO DEL SN DE CELULAS B DE PACIENTES CON LEG NO ACTIVO:

Los sobrenadantes obtenidos de las células B de pacientes con lupus no activo tuvieron un efecto inhibitorio sobre las células B normales (IE= -0.212 ± 0.095) y estimularon a proliferar a las células B de LEG no activo (IE= 0.789 ± 0.230) y de lupus activo (IE= 0.328 ± 0.298). La diferencia entre la respuesta de las células normales y de LEG no activo fué significativa ($p < 0.002$), así como la diferencia entre las células de LEG activo y no activo -- ($p= 0.05$) (ver tabla 2 y gráfica 2).

EFFECTO DEL SN OBTENIDO DE CELULAS B DE PACIENTES CON LEG

ACTIVO: Sobre células B de controles normales estimuló su proliferación (IE= 0.158 ± 0.230), su efecto fué inhibitorio sobre células B de LEG inactivo (IE= -0.096 ± 0.175) y sobre células B de LEG activo indujo proliferación (IE= 0.343 ± 0.316). (ver tabla 3 y gráfica 3).

EFECTO DE SN AUTOLOGOS: La respuesta de las células B de LEG activo, LEG no activo y normales a su SN autólogo no fué diferente en forma significativa a la respuesta obtenida con SN alogénicos de origen afin (LEG activo, - LEG no activo o normales, respectivamente).

EFECTO DE LOS SN SOBRE CELULAS B NO ACTIVADAS IN VITRO: En forma paralela se probaron los diferentes SN de células B de LEG activo, LEG no activo, normales y autólogos sobre las células B de normales, lupus activo y no activo, en condiciones idénticas, excepto por la ausencia de mitógeno (SAC) y la respuesta proliferativa de células no pre activadas fué 2 a 5 veces menor; los índices de estimulación fueron similares con y sin SAC, excepto en el grupo de células B normales con SN autólogo, cuya respuesta fué proliferativa en ausencia de SAC (IE= 0.081) y con SAC - fué inhibitoria (IE= -0.725) con una diferencia significativa ($p < 0.05$).

SOBRENADANTES: Se analizaron los sobrenadantes de las células B de pacientes y controles, y estos no modificaron su actividad al deplementarse, no contienen anticuerpos citotóxicos del tipo IgM y estos SN estimularon la proliferación de una línea celular B dependiente de factor de crecimiento de células B, la RAM-B.

EFECTO DE LOS SN OBTENIDOS DE CELULAS B SOBRE DIFERENCIACION DE CELULAS B: Los sobrenadantes de células B de 12 controles normales, 15 pacientes con LEG no activo y 18 - con lupus activo se probaron sobre células de la línea ce

lular B SKW-CL4, dependiente de factor de diferenciación de células B. Los sobrenadantes de 9 de los 18 pacientes con LEG activo y 4 de los 15 con lupus inactivo indujeron producción de IgM por las células SKW-CL4 2 desviaciones estándar por arriba de la media de 12 controles normales (ver gráfica 4).

EFFECTO DEL SN DE CELULAS B NORMALES EN LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS: Al probar este SN sobre células B normales, indujo disminución en la producción de IgM (-0.064 (-117.88 a 35.097)) (mediana en ng/ml que aumentó o disminuyó la producción de Igs y recorrido de los datos extremos) y la IgG (-10.274 (-124.682 a 351.13)), y este mismo SN estimuló la producción de ambas Igs por las células B de los pacientes con LEG no activo (IgM= 1.893 (-43.232 a 240.043), e IgG= 13.840 (-24.679 a 136.313) ng/ml) y lupus activo (IgM= 12.85 (-247 a 164.402), e IgG= 22.033 (-360.695 a 208.696) ng/ml), (ver tabla 5 y gráfica 5).

EFFECTO DEL SN DE CELULAS B DE PACIENTES CON LEG NO ACTIVO EN LA PRODUCCION DE Igs: Sobre las células B normales - disminuyó la producción de las Igs (IgM= -17.26 (-198.856 a 59.606), e IgG= -1.976 (-126.612 a 88.107) ng/ml) y sobre las células B de LEG no activo aumentó su producción de - IgM e IgG (7.582 (-51.25 a 297.501), y 11.558 (-50.141 a 206.057) ng/ml respectivamente), al igual que sobre las - células B de LEG activo (IgM= 43.033 (-70.343 a 342.822), e IgG= 36.31 (-24.869 a 350.966) ng/ml). La diferencia -

entre la producción de IgM por las células B de controles normales y de pacientes con LEG activo, fué significativa ($p = 0.02$), (ver tabla 5 y gráfica 6).

EFECTO DEL SN DE CELULAS B DE PACIENTES CON LEG ACTIVO EN LA PRODUCCION DE Igs:

Su efecto fué inhibitorio sobre la producción de tanto IgM como IgG por las células B normales (IgM= -22.553 (-68.74 a 63.57), e IgG= -15.765 --- (-176.69 a 178.815) ng/ml) y al contrario, su efecto fué estimulatorio sobre la producción de ambas Igs por las células B de lupus inactivo (IgM= 26.878 (-4.53 a 334.954), e IgG= 23.91 (-9.706 a 306.214) ng/ml) y sobre las células B de LEG activo estimuló la producción de IgM (1.59 (-69.871 a 235.174) ng/ml) e inhibió la producción de IgG (-2.73 (-323.362 a 341.364) ng/ml), (ver tabla 5 y gráfica 7).

TABLA 1: Efecto del SN de células B normales sobre células B preactivadas, de pacientes -- con LEG activo (LEG-A), LEG no activo (LEGnA) y de controles normales (Nles).

El resultado está expresado mediante un índice de estimulación.

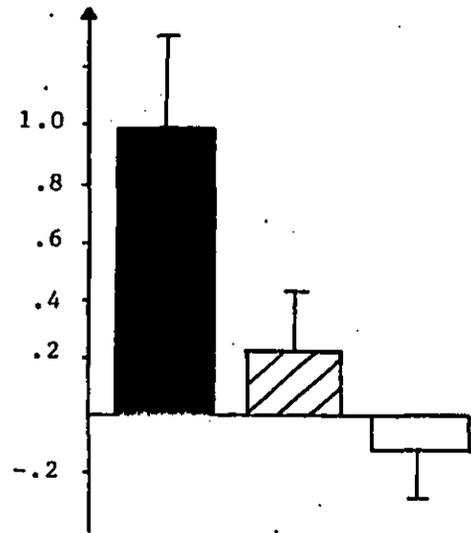
	LEG-A	LEGnA	Nles
	1.162	0.604	-0.014
	1.880	0.654	0.637
	2.057	-0.604	-0.663
	0.536	-0.354	-0.169
	2.925	0.042	-0.203
	-0.027	1.382	-0.319
	-0.544	0.985	-0.691
	0.265	-0.454	-0.725
	1.191	0.134	-0.490
	0.347	-0.280	-0.369
n:	10	10	10
\bar{X}	0.979	0.210	-0.168
EE:	0.337	0.211	0.153

n= número de sujetos

\bar{X} = promedio

EE= error estandar.

GRAFICA 1:



EFFECTO DEL SN DE CELULAS B
NLES. SOBRE CELS. B DE LEG
ACTIVO ■ , LEG NO ACTIVO
▨ Y NORMALES □ .

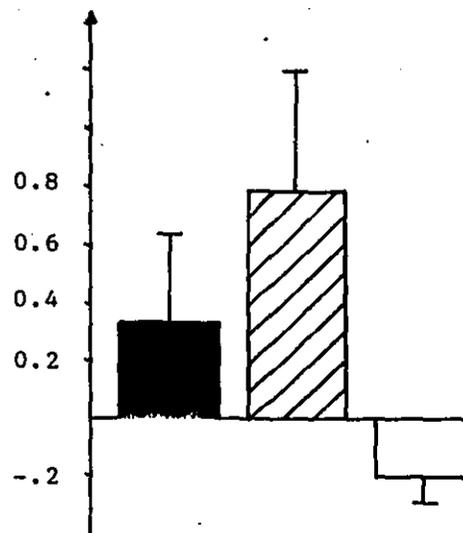
TABLA 2: Efecto del SN de células B de LEG no activo, sobre células B preactivadas, de pacientes con LEG activo (LEG-A), LEG no activo (LEGnA) y de controles normales (Nles).

El resultado está expresado mediante un índice de estimulación.

	LEG-A	LEGnA	Nles
	1.060	2.220	-0.021
	0.046	0.572	0.075
	-0.476	0.048	0.164
	2.685	0.467	-0.461
	0.081	1.175	-0.307
	0.327	0.355	-0.330
	-0.409	0.103	-0.127
	0.411	0.393	0.111
	-0.249	0.739	-0.749
	-0.190	1.819	-0.481
n:	10	10	10
\bar{X}	0.328	0.789	-0.212
EE:	0.298	0.230	0.095

* n= número de sujetos, \bar{X} = promedio, EE= error estandar.

GRAFICA 2:



EFFECTO DEL SN DE CELS. B DE LEG
NO ACTIVO SOBRE CELS. B DE LEG
ACTIVO ■ , LEG NO ACTIVO ▨ Y
NORMALES □ .

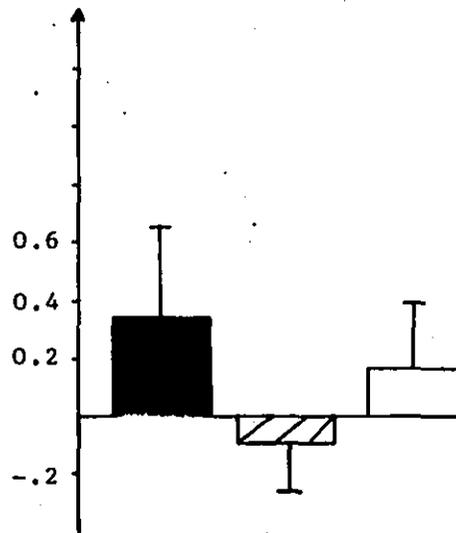
TABLA 3: Efecto del SN de células B de LEG activo, sobre células B preactivadas, de pacientes con LEG activo (LEG-A), LEG no activo (LEGnA) y de controles normales (Nies).

El resultado está expresado mediante un índice de estimulación.

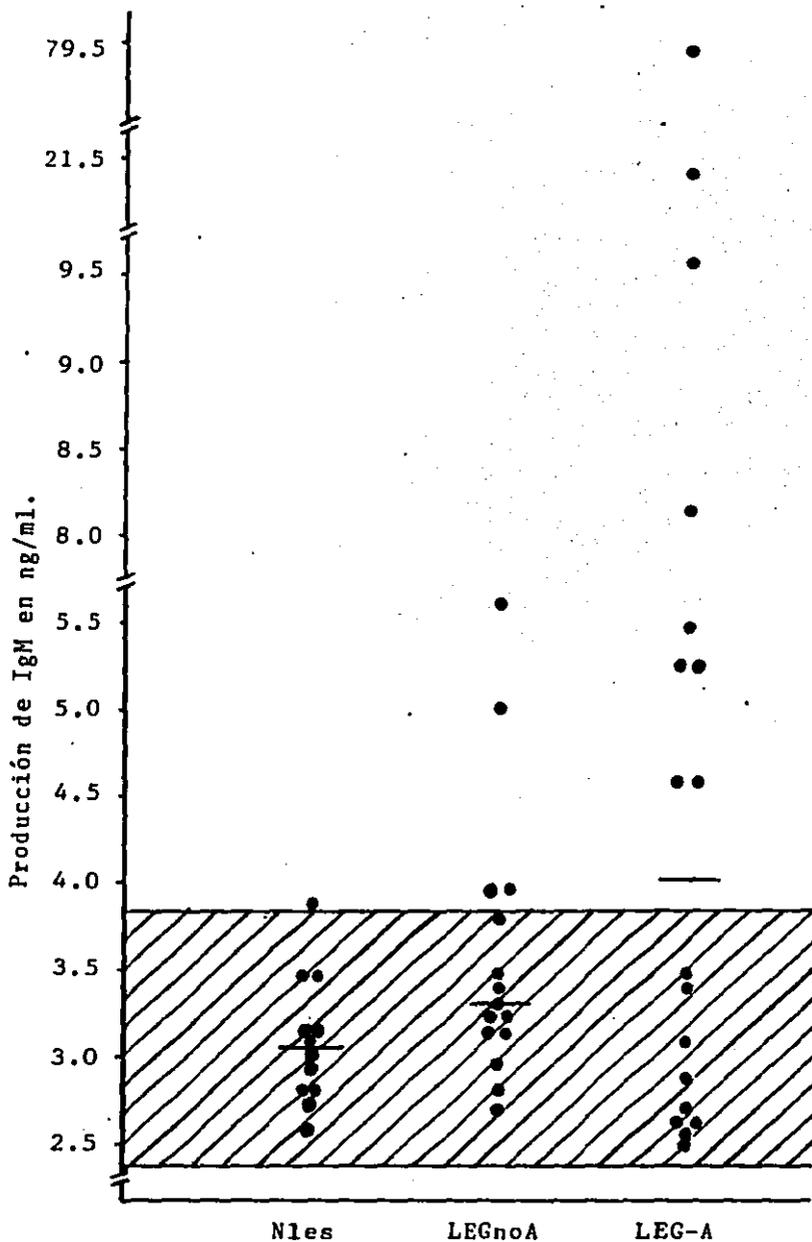
	LEG-A	LEGnA	Nies
	1.818	-0.486	-0.018
	0.691	0.444	-0.519
	-0.479	-0.478	0.193
	0.085	-0.836	0.405
	-0.619	1.012	-0.050
	-0.366	-0.242	0.035
	-0.227	-0.579	0.229
	1.049	-0.102	-0.167
	-0.570	-0.003	2.040
	2.040	0.301	-0.561
n	10	10	10
\bar{X} :	0.343	-0.096	0.158
EE:	0.316	0.175	0.230

* n= número de sujetos, \bar{X} = promedio, EE= error estandar.

GRAFICA 3:



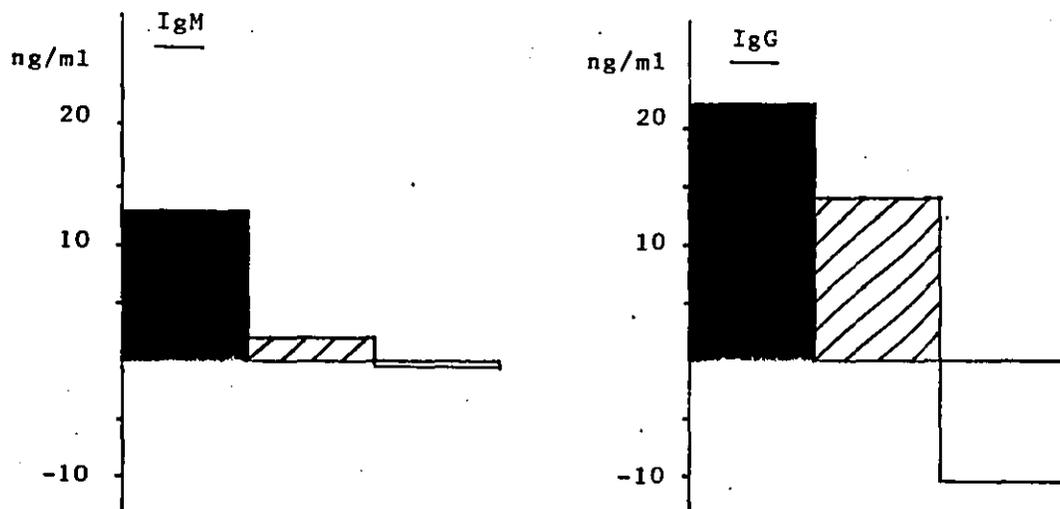
EFFECTO DEL SN DE CELS. B DE LEG
ACTIVO SOBRE CELS. B DE LEG AC-
TIVO ■ , LEG NO ACTIVO ▨ Y --
NORMALES □ .



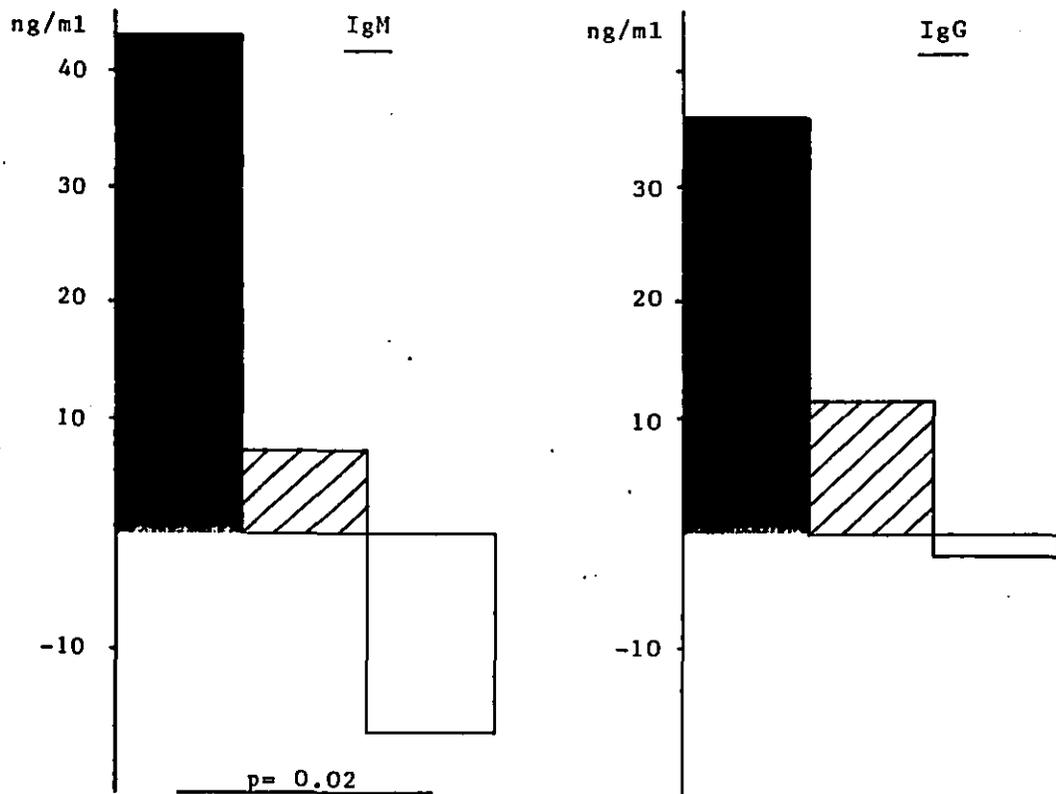
GRAFICA 4: Producción de IgM por las células SKW-CL4 en presencia de los SN de células B normales - (Nles), de LEG no activo (LEGnoA) y activo (LEG-A). *área sombreada= promedio \pm 2 D.E. del normal.

		IgM (ng/ml)	IgG (ng/ml)
SN de c B Nles	C Nles	-0.064 -117.880 - 35.097	-10.274 -124.682 - 351.130
	C LEGnoA	1.893 -43.232 - 240.043	13.840 -24.679 - 136.313
	C LEG-A	12.85 -247.000 - 164.402	22.033 -360.695 - 208.696
SN de c B de LEGnoA	C Nles	-17.260 -198.856 - 59.606	-1.976 -126.612 - 88.107
	C LEGnoA	7.542 -51.250 - 297.501	11.558 -50.141 - 206.057
	C LEG-A	43.033 -70.343 - 342.822	36.31 -24.869 - 350.966
SN de c B de LEG-A	C Nles	-22.553 -68.740 - 63.570	-15.765 -176.690 - 178.815
	C LEGnoA	26.878 -4.530 - 334.954	23.91 -9.706 - 306.214
	C LEG-A	1.59 -69.871 - 235.174	-2.73 -323.362 - 341.364

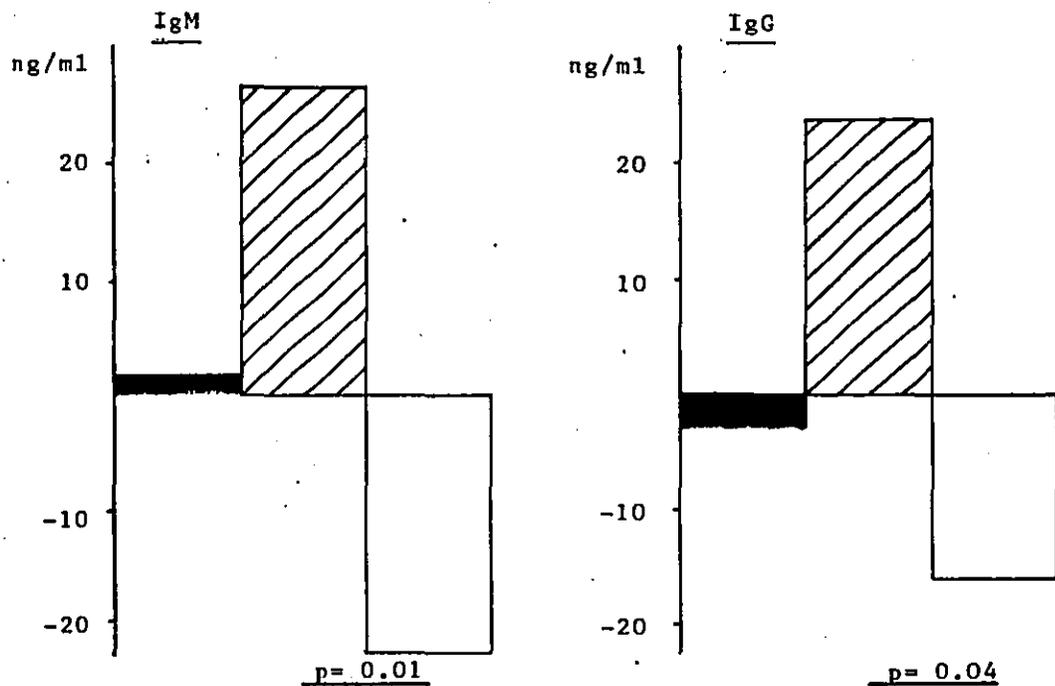
TABLA 5: Efecto de los SN de células B normales (Nles), de pacientes con LEG no activo (LEGnoA) y de LEG activo (LEG-A), en la producción de IgM e IgG por células B de sujetos normales y de pacientes con LEG no activo y activo. Resultado = mediana y el recorrido de los datos extremos.



GRAFICA 5. EFECTO EN LA PRODUCCION DE Igs POR EL SN DE NORMAL -
 SOBRE CELULAS B DE LEG ACTIVO ■ , DE LEG NO ACTIVO ▨ , Y DE NOR
 MALES □ . (MEDIANA EN NG/ML).



GRAFICA 6. EFECTO EN LA PRODUCCION DE Igs POR EL SN DE LEG NO ACTIVO SOBRE CELULAS B DE LEG ACTIVO ■ , DE LEG NO ACTIVO ▨ , Y DE NORMALES □ . (MEDIANA EN NG/ML).



GRAFICA 7. EFECTO EN LA PRODUCCION DE Igs POR EL SN DE LEG ACTIVO SOBRE CELULAS B DE LEG ACTIVO ■ , DE LEG NO ACTIVO ▨ , Y DE NORMALES □ . (MEDIANA EN NG/ML).

DISCUSION

La célula B necesita ser activada, proliferar y diferenciarse para ser capaz de producir anticuerpos, pasos en que requiere de la acción de diferentes interleukinas, en su mayoría producidas por las células T.

Gordon y cols. (1984) y Ambrus y Fauci (1985) demostraron que las células B de líneas celulares malignas son capaces de producir factor de crecimiento de células B. Un año más tarde, Jurgesen y cols. (1986) observaron que las células B normales estimuladas con SAC producen su propio factor de crecimiento. Nosotros encontramos que las células B cultivadas sin ningún mitógeno durante 24 hs., producen factores que aumentan la proliferación y producción de inmunoglobulinas por las células B humanas, de modo -- que pueden ser llamados factor de crecimiento de células B y factor de diferenciación de células B.

El factor de crecimiento cuando es producido por células B normales inhibe a las células B normales y activa las células B de lupus, esto sugiere que las células B de lupus activo están activadas y tienen receptores a los productos de estimulación, por ello, responden al factor producido por células B normales, las células B de LEG inactivo están menos estimuladas y responden menos, y las células normales no lo están.

El factor de crecimiento producido por células B de LEG -

no activo, induce mayor proliferación de las células B de pacientes con lupus no activo que las células de lupus activo y sobre las células B normales ejerce un efecto inhibitorio. Nuevamente las células de LEG están activadas y tienen receptores, pero la producción de factores por células de lupus no activo parecen estimular optimamente a las células de LEG no activo y menos a las de lupus activo. Hay algo que producen las células B de LEG inactivo que actúa preferentemente sobre células B de LEG inactivo y sugiere que estos factores son cuantitativamente diferentes a los producidos por células normales.

El factor de crecimiento producido por las células B de LEG activo induce proliferación de las células B de lupus activo, a las células B de LEG inactivo las inhibe y a las células B normales las estimula a proliferar. Este SN producido por células B de lupus activo es también cuantitativamente diferente del inactivo, sigue estimulando a las células B de LEG activo pero ya no lo hace con las de LEG no activo, tal vez, porque la cantidad de factor de crecimiento sea menor.

Las células B producen también su propio factor de diferenciación, demostrado mediante la estimulación de la línea celular B SKW-CL4, la cual produce IgM en presencia de factor de diferenciación de células B (IL-4 y/o IL-6) (Kikutani y cols. 1985; Kishimoto y cols. 1988; Defrance T. y cols. 1988). Las células B de LEG activo producen -

mayor cantidad de factor de diferenciación de células B - que las células B de lupus no activo y estas a su vez tan bién producen más que las células normales.

Los factores producidos por las células normales y de lupus no activo estimularon la diferenciación de las células de LEG e inhibieron la producción de IgM e IgG por -- las células normales.

En experimentos adicionales se ha podido demostrar que -- los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B tanto de individuos normales como de pacientes con LEG tienen activi dad de IL-4, ya que aumentan la proliferación de linfocitos T en presencia de dosis submitogénicas de FHA (Spits H. y cols. 1987), e inducen la expresión de CD-23 en cél ulas B normales (DeFrance y cols. 1987). Basado en ello, consideramos que gran parte de las acciones descritas -- tanto para células B normales como de LEG están dadas por esta interleukina, que sumada a su interacción con otras probablemente presentes en los sobrenadantes, nos expli quen las diferencias tanto en proliferación como diferenciación observadas en nuestros experimentos.

Recientemente se ha demostrado que la IL-4 tiene influencias inhibitorias sobre la respuesta de células B humanas, esta interleukina, es una señal temprana en la cascada de activación que regula en forma negativa el crecimiento y diferenciación subsecuente de las células B (Jelinek D.F. and Lipsky P.E. 1988), y también induce la producción tan

to de IgG como IgM (DeFrance T. y cols. 1988).

Es probable que las interleukinas 5 y 6 contribuyan, y -- que la combinación de IL-4, 5 y 6 es sinérgica, por lo -- que producen una mayor respuesta de las células B.

Nuestros datos confirman los hallazgos reportados recientemente por Yoshiya Tanaka y cols (1988), quienes encontraron que las células B producen factores con actividad de IL-1, IL-4 e IL-6, y observaron que los factores de -- crecimiento y diferenciación producidos por las células B (vía autócrina), actúan en conjunto y ejercen una acción sinérgica sobre células B en sus diferentes fases de acti vación, proliferación y diferenciación.

Nuestros resultados, por esta vía autócrina, no difieren de los efectos de los factores de crecimiento y diferen- ciación de las células B producidos por células T (Martinez-Cordero y cols. 1986) y apoya el que las células B de pacientes con LEG se encuentran hiperactivas, un hallazgo importante de la alteración en la regulación inmune en el LEG, al inducir, los factores producidos por las células B de LEG sobre las células B SKW-CL4, producción de IgM -- mayor que las células normales, así como reactividad au-- mentada de las células B de LEG en comparación con las cé- lulas B normales, a los factores de crecimiento y diferen- ciación.

El conocimiento de las linfocinas y células B nos dará -- pauta a conocer mejor la actividad policlonal de las célu

las B y su relación directa con la producción de autoanti
cuerpos en esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- Alarcón-Segovia, D., Alcocer-Varela, J., & Díaz-Jouanen, E. (1985) The connective tissue diseases as disorders of immune regulation. *Clinics Rheum. Dis.* 11, 451.
- Alarcón-Segovia, D., Llorente, L., Fishbein, E. & Díaz-Jouanen, E. (1982) Abnormalities in the content of nucleic acids of peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23, - 304.
- Alcocer-Varela, J. & Alarcón-Segovia, D. (1982) Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 69, 1388.
- Ambrus, J.L. jr. & Fauci, A.S. (1985) Human B lymphoma -- cell line producing B cell growth factor. *J. Clin. Invest.* 75, 732.
- Decker, J.L., Steinberg, A.D., Gerswin, M.E., Seaman, W.E., Klippel, J.H., Plotz, P.H., Paget, S.A. (1975) Systemic lupus erythematosus: contrasts and comparisons. *Ann. Intern. Med.* 82, 391.
- Decker, J.L., Steinberg, A.D., Reinertsen, J.L., Plotz, P. H., Balow, J.E., Klippel, J.H. (1979) Systemic lupus erythematosus: evolving concepts. *Ann. Intern. Med.* 91, 587.
- Defrance, T., Aubry, J.P., Rousset, F., Vanbervliet, B., - Bonnefoy, J.Y., Arai, N., Takebe, Y., Yokota, T., Lee, F.,

- Arai, K., DeVries, J., and Banchereau, J. (1987) Human recombinant interleukin 4 induces Fc receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165, 1459.
- Defrance, T., Vanbervliet, B., Pene, J., and Banchereau, J., Human recombinant IL-4 induces activated B lymphocytes to produce IgG and IgM. *J. Immunol.* 141, 2000.
- Estes, D., Christian, C.L. (1971) The natural history of lupus erythematosus by prospective analysis. *Medicine, Baltimore.* 50, 85.
- Falkoff, R.J.M., Zhu, L.P., Fauci, A.S. (1982) Separate signals for human B cell proliferation and differentiation in response to staphylococcus aureus: evidence for a two-signal model of B cell activation. *J. Immunol.* -- 129, 97.
- Gordon, J., Ley, S.C., Melamed, M.D., English, L.S., Hughes-Jones, N.C. (1984) Immortalized B lymphocytes produce B cell growth factor. *Nature* 310, 145.
- Hirano, T., Taga, T., Yasukawa, K., Nakajima, K., Nakano, N., Takatsuki, F., Shimizu, M., Murashima, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Kishimoto, T. (1987) Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. -- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 228.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, -

- K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T., Kishimoto, T. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73.
- Jasin, H.E., Ziff, M. (1975) Immunoglobulin synthesis by peripheral blood cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 18, 219.
- Jelinek, D.F., Lipsky P.E. (1988) Inhibitory influence of IL-4 on human B cell responsiveness. *J. Immunology* 141, 164.
- Jurgensen, C.H., Ambrus, J.L., Fauci, A.S. (1986) Production of B-cell growth factor by normal human B cells. *J. Immunology* 136, 4542.
- Kikutani, H., Taga, T., Akira, S., Kishi, H., Miki, Y., Saiki, O., Yamamura, Y., Kishimoto, T. (1985) Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J. Immunology* 134, 990.
- Kinashi, T., Harada, N., Severison, E., Tanabe, R., Sideras, P., Konishi, M., Azuma, C., Tominaga, A., Bergstedt-Lindqvist, S., Takahashi, M., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K., Honjo, T. (1986) Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II. *Nature* 324, 70.

- Kishimoto, T. and Hirano T. (1988) Molecular regulation of B lymphocyte response. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 485.
- Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Meyerson, P., Villaret, D., Coffman, R., Mosmann, T., Rennick, D., Roeham, N., Smith, C., Zlotnick, A., Arai, K. (1986) Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor I activities and T-cell and mast-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2061.
- Liang, M.H., Socher, S.A., Roberts W.N. and Esdaile, J.M. (1988) Measurement of systemic lupus erythematosus activity in clinical research. *Arthritis Rheum.* 31, 817.
- Martinez-Cordero, E., Alcocer-Varela, J., Alarcón-Segovia, D. (1986) Stimulating and differentiation factors for human B lymphocytes in systemic lupus erythematosus. -- *Cli. Exp. Immunol.* 65, 598.
- Melendro, E.I., Saldate, C., Rivero, S.J., Alarcón-Segovia, D. (1983) T-cell subpopulations in the peripheral blood of patients with connective tissue diseases as determined by flow cytometry using monoclonal antibodies. *Clin. -- Immunol. Immunopathol.* 27, 340.
- Noma, Y., Sideras, T., Naito, T., Bergstedt-Lindqvist, A., Azuma, C., Severinson, E., Tanabe, T., Kinashi, T., Matsuda, F., Yaoita, Y., Honjo, T. (1986) Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. *Nature* 319, 640.

- Ruiz-Arguelles, A., Alarcón-Segovia, D., Llorente, L., Del Giudice-Knipping, J.A. (1980) Heterogeneity of the spontaneously-expanded and mitogen-induced generation of --- suppressor cell function of T-cells on B-cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 23, 1004.
- Saiki, O. and Ralph, P. (1983) Clonal differences in response to T cell replacing factor for IgM secretion and - TRF receptors in a human B-lymphoblastoid cell line. *Eur. J. Immunol.* 13, 31.
- Sawada, Sh., Amaki, S., Takei, M., Karasaki, M., Amaki, I., (1985) Impaired B cell proliferation by staphylococcus aureus cowan 1 in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 28, 1008.
- Spits, H., Yssel, H., Takebe, Y., Arai, N., Yokota, T., - Lee, F., Arai, K., Banchereau, J., DeVries, J.E. (1987) Recombinant interleukin 4 promotes the growth of human - T cells. *J. Immunol.* 139, 1142.
- Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Shaller, J.G., Talal, N., Winchester, R.J. (1982) The 1982 revised criterio for the ---- classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25, 1271.
- Tanaka, Y., Saito, K., Shirakawa, F., Ota, T., Suzuki, H., Eto, S., Yamashita, U. (1988) Production of B cell-stimulating factors by B cells in patients with systemic -- lupus erithematosus. *J. Immunology* 141, 3043.

Urowitz, M.B., Gladman, D.D., Tozman, E.C.S., Goldsmith,
C.H. (1984) The lupus activity criteria count. J. ---
Rheumatol. 11, 783.