

11261
2ej
18



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"
Curso de Maestría en Ciencias Biomédicas
Área Inmunología.

"EFECTO DE LA INTERLEUCINA 4 (IL-4) SOBRE LA FUNCION DE LOS
LINFOCITOS B DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALI
ZADO".

T E S I S

Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Biomédicas

Presenta:

ROCIO ROHENES GALE

Director de Tesis:

DR. JORGE ALCOCER-VARELA

México, D. F.

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.

I N D I C E

	Pág.
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	3
JUSTIFICACION	11
HIPOTESIS	12
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	22
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	42
ANEXOS	44
BIBLIOGRAFIA	47

ABREVIATURAS

BSF:	Factor estimulante de la células B. .
CB:	Células B.
CT:	Células T.
ConA:	Concanavalina A.
CPH:	Complejo principal de Histocompatibilidad.
CPM:	Cuentas por minuto.
FCCB:	Factor de crecimiento de células B.
FHA:	Fitohemaglutinina.
F/H:	Ficoll / Hypaque.
FRT:	Factor reemplazante de células T.
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.
³ HTdR:	Timidina tritiada.
IFN- γ :	Interferon γ .
IL-1:	Interleucina 1.
IL-2:	Interleucina 2.
IL-3:	Interleucina 3.
IL-4:	Interleucina 4.
IL-4r:	Interleucina 4 recombinante.
IL-5:	Interleucina 5.
IL-6:	Interleucina 6.
I.S:	Individuos sanos.
KD:	Kilodaltons.

LEG: Lupus Eritematoso Generalizado.
LEA: Lupus Eritematoso Generalizado activo.
LEI: Lupus Eritematoso Generalizado inactivo.
LPS: Lipopolisácarido bacteriano (Eschericha coli)
Nles.: Normales ó controles.
ng/ml: nanógramos/mililitros.
PBS: Solución buffer de fosfatos.
PI: Punto isoeléctrico.
PMA: Acetato de forbol miristato.
SAC: Estafilococo Aureus de la Cepa Cowan-I.
S/Ns: Sobrenadantes.
(SDS-PAGE): Geles de Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
UI: Unidades Internacionales.

INTRODUCCION

Los linfocitos son células heterogéneas, que participan en forma esencial en la respuesta inmune y se agrupan en dos clases principales: células T y células B.

Las células precursoras de las células T, se originan en la médula ósea, siendo necesario que emigren al timo en donde maduran y se diferencian después de interactuar con las células estromáticas tímicas, para transformarse en células funcionalmente competentes. Las células T están representadas por tres subpoblaciones principales, las células T cooperadores, que como su nombre lo indica, colaboran con otras células, principalmente las células B, para que secreten sus anticuerpos; las células T supresores cuya función es limitar la respuesta inmune y las células T citotóxicas. Las células T cooperadoras se les denomina CD4 y a las supresoras/citotóxicas, CD8, existiendo en condiciones normales una relación entre ellas en el tejido sanguíneo de 2:1.

Las subpoblaciones de células T no sólo difieren en sus marcadores de superficie, sino que además presentan funciones efectoras específicas dentro de la cooperación celular.

Dentro de las células CD4 positivas, existen las inductoras y las propiamente cooperadores que reconocen los antígenos en asociación con las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad CPH.

Existen dos subclases principales de células CD4+, cada uno con un papel distinto en la inmunidad: las células T CD4+ (tipo I) denominados de tipo inflamatorio, que son requeridos para una respuesta inmune efectiva contra patógenos intracelulares y las células T CD4+ (tipo II), que son esenciales para una respuesta inmune humoral contra patógenos extracelulares.

Estos subtipos de poblaciones celulares tienen distintas funciones como la secreción de mediadores solubles, vías de activación y marcadores de superficie. Sólo se han caracterizado en el ratón y rata y parcialmente en el humano (1).

Las células B o linfocitos formadores de anticuerpos, provienen de precursores inmaduros que abundan en la médula ósea. Cuando estas células maduran, se hallan en los órganos linfoides, en grupos denominados folículos linfoides.

Las células B interactúan con un antígeno mediante moléculas de anticuerpos unidas a sus membranas plasmáticas, que actúan como proteínas receptoras. Después de la interacción con el antígeno y las células T, las células B se diferencian en células formadoras de anticuerpos, llamadas células plasmáticas, las cuales secretan anticuerpos con la misma especificidad para el antígeno que la hallada en el receptor de la célula B del que proviene.

La interacción de las células T cooperadores con los determinantes antigénicos, presentados por el macrófago, en el contexto de las moléculas clase II del CPH, constituyen un paso fundamental en el proceso de la respuesta inmune.

El proceso de maduración y de diferenciación de las células B que involucra la transformación de células pluripotenciales a células secretoras de anticuerpos y requieren de dos ciclos: uno de proliferación y el otro de diferenciación.

El primero de ellos se efectúa en un órgano linfóide primario, constituido en las aves por la bolsa de Fabricio, en los mamíferos, por el hígado durante la vida fetal y médula ósea, posteriormente. Este proceso no requiere de la participación de antígeno y genera las clonas de células B inmunocompetentes, que son células B pequeñas en la fase G₀ del ciclo celular y emigran a los órganos linfoides secundarios, en donde la mayoría de ellos son capaces de expresar inmunoglobulinas de superficie.

El segundo ciclo, de proliferación y de diferenciación celular, tiene lugar en los órganos linfoides secundarios y requiere la participación del antígeno, permitiendo la formación de células secretoras de inmunoglobulinas. A esto se le conoce también con el nombre de activación de células B.

Esta activación, se divide en dos etapas: la de inducción, relacionada con los cambios fenotípicos de la célula B en reposo que le permite entrar en la fase G₁ del ciclo celular y la de respuesta del linfocito B activado a factores de crecimiento y diferenciación. Esta, a su vez, puede disociarse en una fase de expansión clonal y otra de maduración.

Normalmente, cuando un antígeno es captado por los macrófagos, procesado y presentado en el contexto de las moléculas clase II del CPH, a los linfocitos cooperadores, estas células se activan, proliferan y liberan un gran número de mediadores solubles como el interferón τ (IFN- τ), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 6 (IL-6). Estos mediadores van a cumplir sus funciones en diversas células blancas donde actúan, principalmente en la célula B, para la producción de anticuerpos.

El concepto de cooperación celular entre las células T y B, aparece desde el momento en que se demuestra la participación de las células T en la producción de anticuerpos. Para explicar los mecanismos de cooperación entre ambos tipos de células, se postularon varias hipótesis. La de mayor relevancia, es el modelo de mediadores solubles liberados por el timo que propone la necesidad de dos señales para inducir a un linfocito a producir anticuerpos.

La primera es el resultado de la interacción entre la inmunoglobulina de superficie de la célula B y el antígeno. La segunda a través de un mediador soluble antígeno-específico liberado por la célula T al ser estimulado por el antígeno.

Este último modelo, que tiene como célula blanco a la célula B, permitió el inicio del estudio de las linfoquinas que intervienen en la producción de anticuerpos (2).

Un factor de crecimiento de células B (FCCB) diferente de la interleucina 2 (IL-2) fue descrito por Howard y cols. (3). Se obtuvo del sobrenadante de cultivo del timoma murino EL-4, estimulado con acetato de forbol miristato (PMA) y la actividad biológica de este sobrenadante aumentó la proliferación de las

células B estimulados con anti-IgM.

Al someterlo a cromatografía de filtración, se encontró que el FCCB, tenía un peso molecular aproximado de 16.5-18.5 KD mientras que el de IL-2 era de 17-18 KD. Además, al absorber la fracción de 18 KD con una clona de células T dependientes de la IL-2 (CT-6) no se perdió la capacidad del FCCB; el mismo resultado se obtuvo cuando se absorbió el sobrenadante total.

Finalmente, a través de un proceso de purificación que incluía precipitación con sulfato de amonio (80-100% de saturación), cromatografía hidrofóbica, isoelectroenfoque preparativo y electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), Farrar y cols. (4), lograron una completa separación del FCCB de la IL-2.

Las características químicas del FCCB fueron las siguientes: poco hidrofóbico, PI (9.3) y un peso molecular de 11 y 14 KD, en dos ensayos independientes.

Swain y cols. (5), demostraron que pueden distinguir dos tipos de FCCB, uno denominado FCCB-I y el FRT que recibió el nombre de FCCB II; Dutton y cols. (6), establecieron una purificación y caracterización bioquímica de este factor también obtenido de sobrenadantes de timoma EL-4.

Vitetta y cols. (7), describieron un factor de crecimiento y diferenciación de células B, el cual estimuló la secreción de los isotipos de inmunoglobulinas y además, midió la cantidad de ARN mensajero de estos isotipos, el cual hallaron aumentado.

Todos estos trabajos, se han considerado como antecedentes de la actualmente conocida interleucina 4 (IL-4) o factor estimulante de células B-I (BSF-I).

Una de las principales actividades biológicas de la IL-4, es su efecto estimulante sobre células B. Además, se ha estudiado su acción sinergista y antagonista con otros mediadores solubles (8). Hasta el momento, se conoce que la IL-4 es secretada por las células T CD4+ (tipo II), por lo tanto participa en funciones de cooperación para la respuesta inmune humoral.

La obtención del BSF-I se realizó, mediante la purificación de los sobrenadantes las células T murinos o la línea celular de timoma (EL-4), estimulados con mitógenos, antígenos o acetato miristato de forbol (PMA). También se obtuvo mediante la tecnología del ADN recombinante.

La IL-4 murina, bioquímicamente se trata de una glicoproteína monomérica, cuya estructura primaria está constituida por una secuencia líder de 20 aminoácidos, (a partir de éste péptido, se construyó el antipéptido conocido como anti-IL4 o 11B11). Su peso molecular es de 20 KD, con un PI de 6.4 a 6.7. No difiere en su peso molecular de la IL-4 humana siendo sus funciones biológicas idénticas(9, 10).

Con respecto a las características genéticas, los genes que codifican para la IL-4 murina y humana, se caracterizaron muy recientemente y se hallaron localizados en el cromosoma 11 y 5 respectivamente ; ambos genes están compuestos por 4 exones y 3 intrones. Se encontró cierta homología genética con otras citocinas principalmente, IL-2, GM-CSF, IFN- γ .

Se ha descrito el papel de varias interleucinas participando en la mielopoiesis. La IL-4 sólo y en combinación con otros factores, tienen efectos de proliferación y diferenciación de casi todas las células precursoras hematopoyéticas (11-13).

Se halló un receptor para la IL-4 en la membrana celular de los precursores de las células T y en las células B estimuladas con LPS; este resultó ser un complejo con una constante de disociación aproximadamente de 80000 Mr. (14).

En varios trabajos se ha demostrado el efecto del BSF-I, obtenido de los sobrenadantes de la línea celular EL-4, los cuales al agregarse a las células B, previamente estimuladas con anti-IgM ó SAC, por periodos de 24 y 36 horas, se observaba un efecto de proliferación. Esta acción era potencializada por el IFN- γ , el cual inducía la expresión de receptores Fc en las células B (15-17).

Se demostró que la IL-4, induce selectivamente la secreción de ciertos isotipos y subtipos de inmunoglobulinas. En diversos trabajos, han utilizado sobrenadantes de la línea celular EL-4 ó líneas celulares T cooperadores y los agregaban a las células B murinas estimuladas con LPS, se producía la IgE, IgM y la IgG1; este efecto era inhibido por el antisuero 11B11 (18-22).

No obstante, han demostrado que la IL-4 facilita la secreción de IgE, IgM y la IgG1; observando una marcada supresión en la secreción de IgM, IgA, IgD, IgG3 e IgG3b (23,24).

Durante el proceso de activación, las células B estimuladas, por la IL-4, expresan un receptor para el fragmento Fc de la IgE (IgE/FcERI), este receptor se halló en células cebadas y basófilos y se le denominó, molécula CD23.

Se produjo y caracterizó un anticuerpo monoclonal, denominado Acm. 25, específico para el antígeno CD23. El fenómeno de producción de IgE y expresión de CD23, es inhibido por la PGE2, anti-CD23 e IFN- γ (25-27). La IL-4, también aumenta la expresión de moléculas clase II del CPH, en la membrana de las células B en reposo (28,29). Varios autores han demostrado que el IFN- γ y la PGE2, inhibieron la expresión del antígeno CD23 y las moléculas clase II del CPH, a través de un mecanismo diferente, sin alterar la unión de IL-4 a su receptor (30,31).

También, se ha estudiado el papel de la IL-4/IL-2 sobre las células B normales estimuladas con SAC, las células B monoclonales de pacientes con leucemia linfocítica crónica y en clones de células B. En varios trabajos se pudo demostrar que la IL-4 se requería en las primeras 24 horas del cultivo y se evidenció un efecto inhibitorio en la proliferación pero, no en la diferenciación, cuando agregaron el IFN- γ , este disminuyó el efecto supresor de la IL-4 en la proliferación (32-35).

Diversas interleucinas, tuvieron acción sobre la respuesta dada por las células B. En un trabajo, se demostró maduración de las células B murinas en reposo y propagaron la proliferación de blastos activados (37).

La proliferación y diferenciación de las células B se da en respuesta a varias interleucinas. Se ha comprobado que la IL-2 y la IL-5 tienen efectos de diferenciación y la IL-4 efecto proliferativo en las células B activadas. No obstante, observaron

su acción cuando agregaron la IL-2 y la IL-4 en los estadios de maduración.

Los autores los cuales concluyeron que el nivel máximo de respuesta de estas células preactivadas para diferenciarse, era bajo la acción de la IL-2 ya que la IL-4 antagonizó el efecto proliferativo de la primera, pero no la acción de diferenciación. Además, hipotetizan que la IL-4 sólo, no pudo promover la proliferación y diferenciación de blastos de células B murinas estimuladas con anti-Ig; sugiriendo que otras linfocinas se requirieron para facilitar la secreción de IgG1. Demostrando además, que este factor era indispensable en las primeras 48 horas y las últimas 24 del cultivo, cuando agregaron IL-2 e IL-5 se produjo la secreción de IgG1 e IgA (38,39).

Melchers y cols. (39), clasificaron a esta citocina, dentro de los factores producidos por las células T activados y propusieron que dicho factor actuaba en la fase G2 del ciclo celular de las células B activadas por antígenos o anti-Igs, considerándose por lo tanto, como un factor de diferenciación.

Por el contrario, Howard y Paul, propusieron que las células B en reposo, cuando se estimulan con anti-Igs y se les agregaba la IL-4 esta actuaba en la fase temprana G1 del ciclo celular, por lo tanto, le consideraron como un factor de proliferación.

Hasta el momento, varios autores han planteado el mecanismo de acción de la IL-4 en las células B.

Se sabe que esta citocina se une a un receptor de alta afinidad, con una constante de disociación aproximadamente de 3×10^{-11} M y un peso molecular de 60-70 KD en el ratón y de 140 KD en el humano. Este proceso de unión de la IL-4 a su receptor, presente en la célula B en reposo, no induce el mecanismo del inositol, ni la movilización de calcio, ni traslocación de proteína cinasa C en la superficie de las células B, o depolarización de la membrana.

Cuando la IL-4 se une a su receptor presente en células B activadas por entrecruzamiento de las inmunoglobulinas IgG/IgD secretadas para un antígeno, este fenómeno conlleva a la activación de la fosfolipasa C que conduce a la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato y diacilglicerol, formándose fosfoinositol trifosfato, el cual estimula la liberación de iones de calcio del retículo endoplásmico.

El calcio liberado y el diacilglicerol producen traslocación de las proteínas cinasas C a la membrana plasmática, ocurriendo fosforilación de las proteínas de la misma.

El cambio de PH intracelular y el potencial de membrana ocasionan cambio de iones de sodio e hidrogeno. Esta cascada también conlleva a otra vía, produciéndose episodios que se traducen en el incremento de la transcripción de genes que codifican para C-fos, C-Myc, Ia.

Lo más claro hasta el momento es que la IL-4 unida a su receptor, parece traducir señales de vía de activación de cinasas asociadas a membrana, fosforilando las proteínas (40-43).

El espectro de acción de la IL-4 es amplio. En lo sucesivo, revisaré su efecto sobre la serie linfoide con respecto a su efecto proliferativo, en los timocitos inmaduros para su diferenciación

en células inmunocompetentes, como células citolíticas ante un estímulo antigénico específico.

Los linfocitos T CD4+ (tipo II) no secretan, ni requieren de IL-2 para su proliferación, para ello, sólo dependen de la IL-4. Este subgrupo de células T es aparentemente, el más importante en la inducción de la respuesta inmune humoral, mientras que las células T CD4+ (tipo I) participan fundamentalmente en reacciones de hipersensibilidad tardía.

La IL-4 recombinante y la obtenida de los sobrenadantes purificados, es un potente coestimulante de células T humanos y murinos en reposo o estimulados con PMA, el factor facilitó el aumento del volumen celular e incrementó la síntesis de ADN. Además, causó un efecto proliferativo en cultivos de largo tiempo de líneas celulares T dependientes de IL-2, como la HT-2, también en clones de células T CD4+ (tipo II), las cuales bajo un estímulo antigénico secretaban sus propias interleucinas. Aparentemente, parece que la IL-4 induce primariamente el crecimiento de las células cooperadoras, por un mecanismo autócrino, también induce la activación y diferenciación de células B.

El efecto de proliferación de la IL-4 fué inhibido por el 11B11, con el propósito de descartar que esta acción no era producida por la IL-2 (44-47).

En varios trabajos, se examinó la regulación de células T citolíticas y células LAK (células asesinas, por efecto de IL-2) por acción de la IL-2 y la IL-4. Observándose que la generación de células T citolíticas, se incrementó por el BSF-I, no siendo igual para la actividad inductora de las LAK; en ambos tipos de células, la IL-2 las condujo a cumplir sus respectivas actividades biológicas (48-54).

La IL-3 y la IL-4, actuando concomitantemente, fueron capaces de inhibir la función de las células LAK, también se ha observado que la IL-4 tiene un efecto inhibitorio en la capacidad de la IL-2 para generar las células LAK humanas (55).

Las células NK (asesinas naturales), son una población diferentes de las células T, cuya actividad citotóxica, no está restringida por el CPH. Se demostró que la IL-4 tiene un profundo efecto inhibitorio de la activación de células NK mediada por la IL-2 (56). Los receptores para la IL-4 en la membrana celular de líneas T (HT-2) y en las células B de linfoma (BCL1) pueden interactuar con los receptores para la IL-2, llevando a un fenómeno de sinergismo produciendo un efecto proliferativo, dado por ambas citocinas (57).

También se observó, al agregar la IL-4 en combinación con la IL-6 a timocitos estimulados por PMA, que maduraban y desempeñaban sus funciones como células inmunocompetentes. En líneas celulares T, como la HT-2 y la CTLL dependientes de IL-2, proliferaron en presencia de IL-4 más el GM-CSF (58,59).

Se ha demostrado el efecto de la IL-4 como factor activador de los macrófagos. Así, el BSF-I en combinación con el IFN- γ estimuló la expresión de moléculas clase II del CPH, el antígeno CD23, incrementó la producción de C2 en los macrófagos y aumentó la habilidad de la misma como célula presentadora de antígeno. (60-

62).

Mc Innes y cols.(63), observaron que al agregar éste factor a células precursoras de monocitos, en cultivos de varios días; se incrementó el porcentaje de formación de núcleos en las células gigantes multinucleadas. El mayor número de núcleos se observó a los 6 días del cultivo, concluyendo que la IL-4 tiene un efecto de maduración en los macrófagos, y en combinación con los IFNS(τ , β , α) y estimulan la actividad tumoricida dependiente de anticuerpos (64).

Esta citocina, induce maduración y diferenciación de mastocitos del tejido conjuntivo en sinergismo con la IL-3 y la IL-5, aunque la primera actúa en fase más temprana que la segunda. La IL-4 con la IL-5 puede interactuar para promover la diferenciación de los eosinófilos (65-69).

El BSF-I, promueve la síntesis de ADN en los fibroblastos murinos e inmortalizados, posiblemente a través de receptores de superficie (70).

En células B normales y de pacientes con leucemia linfocítica crónica, se comprobó que disminuyó la expresión de la molécula CD5, presente en la membrana de éstas células (71).

Mediante esta revisión de los diversos efectos del BSF-I, podemos concluir que juega un papel primordial en la amplificación de la respuesta inmune humoral; no obstante, el efecto de este factor en patologías del sistema inmune no ha sido evaluado. Tal es el caso del Lupus Eritematoso Generalizado (LEG), motivo que llevó a cabo este trabajo.

En términos generales, el LEG es el prototipo de patología auto-inmune, de etiología desconocida, considerada como un trastorno de la inmunorregulación que se caracteriza por varias alteraciones inmunológicas, principalmente en la función de las células T y B.

Puede resultar de la interacción de varios factores como los genéticos, sexo, raciales, hormonales y ambientales.

El hecho básico de estos trastornos, reside en la hiperactividad de las células B, produciéndose hipergammaglobulinemia con la secreción de múltiples anticuerpos, contra los antígenos propios (auto-anticuerpos) o extraños.

La hiperactividad de las células B puede explicarse por:

- 1) Un trastorno intrínseco en las células B para responder a los diversos factores de crecimiento y diferenciación.
- 2) Una disminución en la función de las células T supresoras que provoca un descontrol en la actividad de las células B.
- 3) Un aumento en la función de las células T de ayuda.
- 4) Un defecto en la comunicación intercelular, por trastorno a nivel de los macrófagos, así como la producción y actividad de los mediadores solubles, producidos por las diversas células que desempeñan un papel importante, para que desencadenen una respuesta inmune normal.

Se han realizado varios trabajos, que afirman hechos que revelan anomalías en el circuito de la inmunorregulación en el LEG, no sólo en la interacción celular, sino en la activación y respuesta a las interleucinas, lo cual de alguna manera, tiende a

favorecer o incrementar la proliferación o diferenciación de células B.

Varios autores han demostrado las diferentes alteraciones, en la producción y actividad de algunas citocinas. Así, se ha comprobado que existe un defecto en la actividad y producción por los macrófagos de IL-1, en los sujetos con LEG, además, en la respuesta de las células T a la misma (72).

También comprobaron que la producción de IL-2 y respuesta de las células T a la misma, se hallaba disminuida (73) y Además, observaron que las células B de los pacientes con LEG, tenían una marcada producción de factor de crecimiento y diferenciación de células B (FCCB y FDCB) (74). Simultáneamente, estos factores también fueron investigados en el LEG, demostrándose que se producen en forma aumentada por las células B mediante un mecanismo autócrino, lo cual contribuye al aumento en la proliferación y diferenciación de las mismas (75).

JUSTIFICACION

Las alteraciones en las células B de los pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG), puede obedecer a diversas alteraciones intrínsecas ó de los mediadores solubles que modifican la función de los linfocitos B, con la subsecuente secreción de auto-anticuerpos.

HIPOTESIS

Es posible que la producción de IL-4 esté alterada en las células T de sangre periférica de los pacientes con LEG, en comparación con las células T de sujetos sanos.

Las células B de los pacientes con LEG, tendrán posiblemente una respuesta alterada a una fuente exógena, normal de IL-4r, a los sobrenadantes de las células T de individuos sanos y de los pacientes ó al agregarles a las células B, IL-4r/IL-2 e IL-2 sólo.

OBJETIVOS

Estandarizar el método para la producción de la IL-4 en células T de individuos normales y determinar su cinética, para considerarla como patrón en el estudio de la producción de éste factor en los pacientes con LEG

Analizar la diferencia en que se presentan alteraciones en la respuesta de células B, bajo el efecto de la IL-4, al establecer comparaciones con los resultados de los individuos normales.

Conocer la cinética de la producción de la IL-4, mediante la estimulación de las células T, con el mitógeno, la concanavalina A (ConA).

Estudiar la respuesta proliferativa de las células B, a una fuente normal de IL-4 recombinante (IL-4r).

Conocer el efecto sinérgico o antagonista de la IL-4 con la interleucina 2 (IL-2), en las células B normales y en la de los pacientes con LEG.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron (15)pacientes de sexo femenino, con edades comprendidas, entre los 23 y 40 años. Todos los pacientes, llenaron los criterios establecidos, para el diagnóstico de LEG , 5 de ellos presentaban actividad clínica de la enfermedad (manifestaciones renales, dermatológicas, artritis y hematológicas) y/o serológicas como hipocomplementemia, trombocitopenia, linfopenia y captación de ADN aumentada; los otros 10 pacientes, no presentan actividad de su padecimiento. Al momento de su estudio, ningun paciente recibia tratamiento con corticosteroides o inmunosupresores.

CONTROLES: Se estudiaron 10 sujetos voluntarios sanos, de igual sexo y en iguales limites de edad, que los pacientes.

OBTENCION DE LAS MUESTRAS: De cada individuo se extrajeron 60 mililitros de sangre periferica con jeringa heparinizada, bajo condiciones adecuadas de esterilidad.

SEPARACION DE LAS CELULAS: Cada muestra sanguinea fue diluida con un volumen igual de PBS y colocada sobre ficoll/hypaque (F/H) de una densidad de 1077 gr/ml, se centrifugó a 2500 rpm por 30 minutos y a continuación, las células mononucleares se obtuvieron de la fase intermedia del gradiente, fueron lavadas en tres ocasiones con PBS y centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Posteriormente se determinó la viabilidad celular en una alicuota, en presencia de azul tripano y con la ayuda de un microscopio de luz directa. Las células mononucleares se depositaron en una caja de petri y se incubaron a 37°C, por un periodo de 2 horas, para remover las células monocíticas por adherencia al vidrio.

Las células T y las células B se obtuvieron a partir de las células mononucleares, depletadas de macrófagos, como se explicó anteriormente, se incubaron las células restantes toda la noche a 4°C con eritrocitos de carnero al 4 % , para lograr la formación de rosetas. Al día siguiente, esta mezcla fue resuspendida en frio, colocada sobre F/H y centrifugada a 2500 rpm por 20 minutos a 4°C. Se recolectó la fase intermedia que contenía las células B y se realizó un nuevo gradiente, en la misma forma descrita anteriormente. El aislamiento de las células T se efectuó, colectando el precipitado del gradiente y lisando los eritrocitos con cloruro de amonio al 0.83% en tris-HCl PH 7.2, las células se lavaron en PBS 10 minutos a 1400 rpm y se realizó otro lavado con PBS, se centrifugó a 1400 rpm por 10 y se resuspendieron las células T, ajustándolas con medio a una concentración de 5×10^6 células/ml.

Para purificar más las células B, se les agregó 0.5 ml del anti-CD3(OKT3) por cada 10 millones de células, se incubaron en frio, por 30 minutos, se lavaron una vez con medio RPMI 1640 y se centrifugó a 4°C, 10 minutos a 1200 rpm. Posteriormente se agregó complemento de conejo diluido 1/4, 0.5 ml por cada 10 millones de células, se incubaron a 37°C por 30 minutos, se lavaron una vez en

medio RPMI-1640 y se centrifugaron a 1400 rpm por 10 minutos. Luego se resuspendieron las células y se ajustaron, en una concentración de 3×10^5 células/ml.

La pureza de las células B se comprobó utilizando los antisueros OKB2 y OKB7, luego se les agregó anti-Igs (M ó G) marcadas con fluoresceína. Se realizó el recuento en un microscopio de inmunofluorescencia, obteniéndose un 95% de células B positivas para IgM/IgG.

CULTIVO CELULAR: Para los cultivos celulares se utilizó el medio RPMI 1640, suplementado con penicilina (100 UI/ml), estreptomocina (100 μ gr/ml), glutamina 2 mM y suero fetal bovino (10%). Se usaron microplacas de 96 pozos, para incubar 100 microlitros de las células B en una concentración de 3×10^5 , se incubaron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera con CO₂ al 5% y humedad al 100%.

Las células T, en los tres grupos estudiados, se utilizaron a una concentración de 5×10^6 células/ml.

OBTENCION DE SOBRENADANTES DE LOS LINFOCITOS T (ENRIQUECIDOS DE IL-4): Los primeros bioensayos que se realizaron para la obtención de la IL-4 de los sobrenadantes de las células T de los individuos sanos fueron los siguientes:

-Estandarizar la concentración del mitógeno (ConA) para la estimulación de las células T, se utilizaron diferentes concentraciones de ConA (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 μ gr/ml).

Pudimos concluir, que al usar las células T de los controles en una concentración de 5×10^6 células/ml, en un volumen de 100 microlitros, más los 100 microlitros de las diversas concentraciones del mitógeno, la máxima proliferación de las células T normales, se obtuvo cuando se estimularon con 2 μ gr/ml del mitógeno.

Una vez estandarizada la concentración que se debía utilizar de ConA, para estimular las células T, se realizaron los siguientes bioensayos para saber el tiempo de incubación y para comprobar si el sobrenadante debía ser utilizado sin diluir o diluido, para estimular a las células B de los controles y los pacientes.

-Los linfocitos T normales, que utilizamos en una concentración de 5×10^6 células/ml, estimulados con ConA (2 μ gr/ml), los incubamos a 37°C en diversos periodos de tiempo 24, 48, 72 y 96 horas. Para obtener la IL-4 los absorbimos con células T estimulados con FHA y con células B estimuladas con SAC, para eliminar la IL-2 y factores de diferenciación.

Los sobrenadantes absorbidos los usamos sin diluir y diluidos 1/2, 1/4 y 1/8, se les agregaron a las células B normales que habían sido previamente estimuladas con SAC y en condiciones de reposo, en cultivos de 72 horas.

La máxima proliferación que se obtuvo de las células B normales fue cuando se utilizaron los sobrenadantes sin diluir y habían sido incubados a 37°C por 48 horas.

-Para la estandarización de la concentración que debía ser usada de la IL-4r, realizamos varios ensayos con células B estimuladas

y sin estímulo de individuos sanos, para ver el efecto proliferativo de este factor sobre dichas células.

Utilizamos 100 microlitros de las células B (3×10^6 células/ml), se cultivaron en condiciones basales y estimuladas con SAC, por un periodo de 72 horas y se les agregaron las diferentes concentraciones de IL-4r, (600, 400, 100, 50 UI) hasta completar las 48 horas del cultivo y poder medir la incorporación de timidina tritiada, para observar el efecto proliferativo, el cual fue mayor cuando se usó la IL-4r en una concentración de 600 UI.

- La IL-2 que utilizamos, se obtuvo de la línea celular Jurkat, estimulada con FHA. Fue titulada tomando como referencia una curva estandar de IL-2 recombinante, la cual se diluyó en diferentes concentraciones (200, 100, 50, 10, 5 y 1 UI) y se probó su actividad, con la línea celular CTLL dependiente de IL-2. Se observó la concentración de IL-2 recombinante que producía la máxima proliferación de la línea celular; así se midió la concentración de IL-2 que contenían los sobrenadantes, la cual fue de 4 UI.

Posteriormente, los sobrenadantes de la línea celular Jurkat se usaron en diversas concentraciones (4, 8, 16, 32, 64, 128 UI), con previa concentración, y se les agregó a las células B en reposo y estimuladas, midiéndose la incorporación de timidina tritiada, la cual fue mayor cuando se usó el sobrenadante que contenía la IL-2, en una concentración de 128 UI. (Ver págs. 17-20).

Como se explicó anteriormente, cuando ya se estandarizó la obtención de los sobrenadantes de las células T para la obtención de la IL-4, se tomaron las alícuotas de los sobrenadantes de los individuos normales y pacientes, se transfirieron a células T normales previamente activadas con fitohemaglutinina ($2 \mu\text{gr/ml}$), se incubaron a 37°C , por un periodo no menor de 5 horas, luego se centrifugaron y se filtraron los sobrenadantes absorbidos, se congelaron a -20°C hasta el momento de ser usados.

Las células T normales activadas, que se usaron para absorber los sobrenadantes de las células T de los individuos sanos y de los pacientes, se mantuvieron en cultivo, en medio completo suplementado, con IL-2 al 3%, por un periodo no menor de 15 días de cultivo, estas células fueron usadas, en una concentración de 5×10^6 células/ml, para la absorción de la IL-2. Se usaron células B normales activadas con SAC (1/4000 V/V), en una concentración de 3×10^5 células/ml, mantenidas en cultivo durante 72 horas; se utilizaron para absorber, los factores de diferenciación presentes en los sobrenadantes de las células T de los controles y los pacientes.

ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD DE LOS SOBRENADANTES DE LINFOCITOS T DE CONTROLES Y PACIENTES, IL-4r/IL-2 E IL-2: Se cultivaron las células B normales y de los pacientes, en una concentración de 3×10^5 células por pozo, estimuladas con SAC y sin estímulo, en ambos ensayos las células B se cultivaron durante 72 horas, posteriormente, se removieron 100 microlitros y se reemplazaron por 100 microlitros de la IL-4 recombinante (600 UI), los sobrenadantes de las células T, de los individuos sanos y los pacientes (sin diluir y habiendo sido incubados a 37°C por 48

horas; para el ensayo de la IL4r/IL-2 se utilizaron 100 microlitros de IL-4r (600 UI) por 24 horas, se removían los 100 microlitros y se agregó igual volumen de la IL-2 (128 UI) por otras 24 horas; para el experimento con la IL-2 (128 UI) se agregaban también 100 microlitros. A las 72 horas del cultivo se determinaron los marcadores de activación de células B (HB-5 y HB-2) y se realizaron los ensayos de proliferación y diferenciación.

ENSAYOS DE PROLIFERACION DE LAS CELULAS B: El crecimiento de las células B normales y de los pacientes, se determinó por la medición de la captación de la timidina tritiada (3HTdR), después de un pulso (0.5 microcuries), agregándola durante las últimas 12 horas del cultivo de 72 horas.

ENSAYOS DE DIFERENCIACION DE LAS CELULAS B: La diferenciación de las células B, normales y de los pacientes, se realizó de igual manera a la descrita en el ensayo de actividad de la IL-4, con la variación que el cultivo se incubó, hasta las 96 horas. Se recolectaron los sobrenadantes y posteriormente, se midió la concentración de inmunoglobulinas M y G, por el método de Elisa.

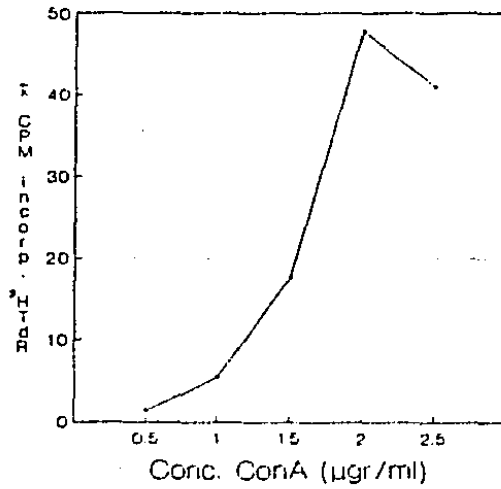
METODO DE ELISA: Inicialmente se realizaron curvas estandares para los dos isotipos de inmunoglobulinas. Se utilizaron microplacas de 96 pozos, se depositaron 100 microlitros del fragmento F(ab)2 de anti-IgG o anti-IgM de cabra, a una concentración de 10 µgr/ml. en solución amortiguadora de carbonato (PH= 9.6); las microplacas se incubaron por 12 horas 4°C, se lavaron con PBS-Tween 20, a una concentración de 0.05%; luego, se colocaron 100 microlitros de albúmina, por un período de 1 hora, a una temperatura de 37°C, nuevamente se lavaron las microplacas y se les agregaron 100 microlitros de IgM o IgG, se incubaron 1hr. a 37°C se lavaron las microplacas y se les añadió 100 microlitros del conjugado por 1hr. a 37°C (anti-IgM ó anti-IgG marcadas con fosfatasa alcalina 1/1500), se incubaron por una hora a 37°C, se lavaron y se les agregó 100 microlitros del sustrato enzimático, p-nitrofenil/fosfato; se paró la reacción a los 30 minutos con ácido sulfúrico y se midió la absorbancia, en un espectrofotómetro. La cantidad de inmunoglobulinas, se calculó en una curva estandar, por placa de ensayo.

Para medir la concentración de IgM o IgG de los sobrenadantes recolectados de las células B de los pacientes y los controles, se agregaron 100 microlitros sin diluir del sobrenadantes, en vez de agregar los 100 microlitros de la IgM o IgG comercial, que se usaron para realizar la curva, fue lo único que varió en el procedimiento, todo lo demás fue idéntico a lo descrito anteriormente. La concentración se calculó en una curva estandar como se explicó anteriormente, y se expresó en ng/ml.

ESTANDARIZACION DE LA CONCENTRACION DE ConA

CT Nles (5×10^6 células/ml) + ConA C P M	
0.5 $\mu\text{gr/ml}$	1347 \pm 124
1.0 $\mu\text{gr/ml}$	5486 \pm 441
1.5 $\mu\text{gr/ml}$	17549 \pm 2548
2.0 $\mu\text{gr/ml}$	47853 \pm 3789
2.5 $\mu\text{gr/ml}$	40950 \pm 1028

Este bioensayo fué realizado por
triplicado con CT de 5 sujetos Nles.



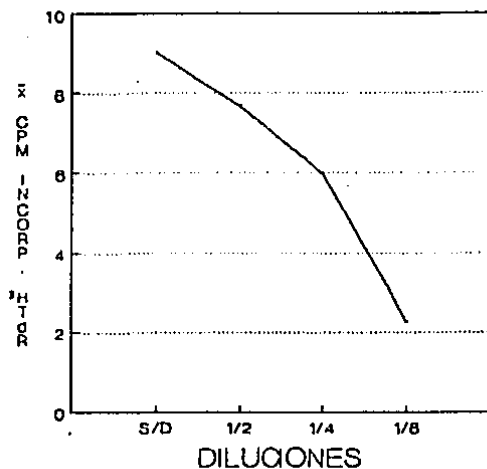
ESTANDARIZACION DE TIEMPO DE INCUBACION
Y CONCENTRACION DE LOS S/Ns Nica.

SOBRENADANTES

TIEMPO INCUBACION	S/D	DILUCIONES		
		1/2	1/4	1/8
24 hrs.	6651:2603	2317:802	1264:93	916:44
48 hrs.	9010:1024	7873:654	5276:110	2260:238
72 hrs.	7104:628	4979:2607	2986:81	1062:62
96 hrs.	6828:671	6126:685	4960:88	1422:466

• \bar{x} CPM de Incorporación de HTdR en CB Nica
S/D sin diluir

El \bar{x} de CPM fué similar para las CB Nica
con y sin SAC. El experimento se efectuó
por triplicado con CT de 6 sujetos Nica.



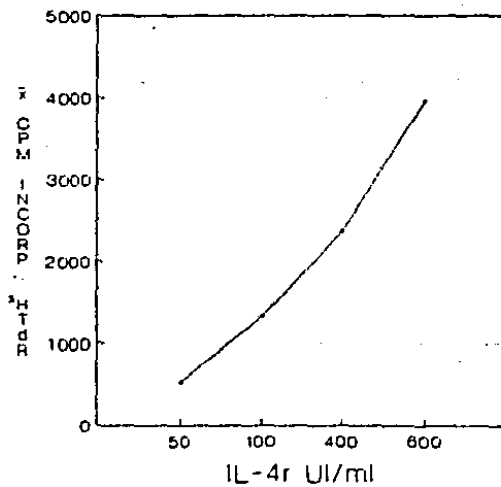
EFFECTO DE S/Ns DE 48 hrs. DE INCUBACION

ESTANDARIZACION DE LA CONCENTRACION
DE IL-4r EN CB Nles.

CONCENTRACION DE IL-4r UI/ml	\bar{x} CPM
50	520 \pm 240
100	1325 \pm 177
400	2363 \pm 592
600	3960 \pm 85

• \bar{x} CPM de incorporación de ^3H TdR en CB Nles

El \bar{x} de CPM fué similar para las CB Nles con y sin SAC. El experimento se efectuó por triplicado con CB de 3 sujetos Nles.

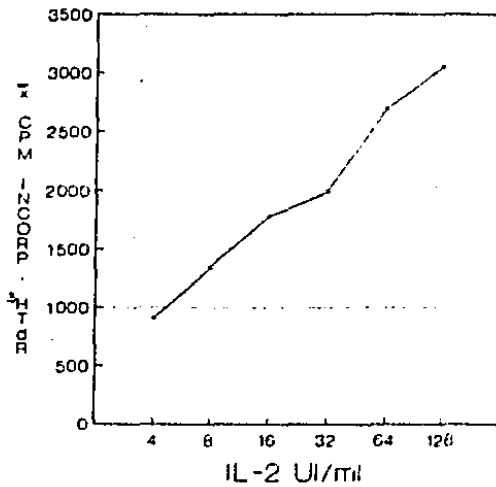


ESTANDARIZACION DE LA CONCENTRACION
DE IL-2 EN CB Nles.

CONCENTRACION DE IL-2 UI/ml	\bar{x} CPM
4	906 \pm 70
8	1341 \pm 116
16	1778 \pm 151
32	1992 \pm 93
64	2692 \pm 190
128	3052 \pm 131

• \bar{x} CPM de la incorporación de HTDR

El \bar{x} de CPM fue similar para las CB Nles con y sin SAC. El experimento se efectuó por triplicado con CB de 5 sujetos Nles.



ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se analizaron, mediante el análisis de Variancia de una via, para obtener la diferencia entre los promedios de los tres grupos (los pacientes con LEG activo, inactivo y controles).

RESULTADOS

TABLA I (pág. 25) Y GRAFICA I (pág. 31)

EFFECTO DE LOS SOBRENADANTES DE LOS LINFOCITOS T DE LOS INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON LEG ACTIVO E INACTIVO: Cuando se agregaron a las células B normales estimuladas los sobrenadantes de las células T de los controles, se produjo un efecto proliferativo y se encontró una diferencia significativa entre los promedios de los tres grupos ($F = 321.80$, $p < 10^{-6}$).

Cuando se agregaron los sobrenadantes de las células T de los pacientes con LEG activo, a las células B estimuladas de los controles y de los pacientes, se observó una mayor actividad proliferativa.

La diferencia entre los promedios de los tres grupos fue significativa ($F = 140.29$, $p < 10^{-6}$).

Fue menor la proliferación de las células B estimuladas de los pacientes con LEG activo, inactivo y controles, cuando se les agregaron los sobrenadantes de las células T de los sujetos con LEG inactivo.

Se observó una diferencia significativa, entre los promedios de los tres grupos ($F = 166.53$, $p < 10^{-6}$).

EFFECTO DE LA INTERLEUCINA 4 RECÓMBINANTE (IL-4r): Cuando se agregó la IL-4r a las células B estimuladas de los pacientes con LEG inactivo, hubo una mayor proliferación que la observada en los individuos con la enfermedad inactiva y en los sujetos sanos. La diferencia entre los promedios de los tres grupos fue significativa ($F = 38.02$, $p < 10^{-6}$).

EFFECTO DE LA INTERLEUCINA 4 RECOMBINANTE Y LA INTERLEUCINA 2 IL-4r/IL-2: Cuando se agregaron estas dos interleucinas a las células B estimuladas de los pacientes con LEG activo, se obtuvo menor actividad proliferativa.

Hubo una diferencia significativa entre los promedios de los tres grupos ($F = 239.23$, $p < 10^{-6}$).

EFFECTO DE LA INTERLEUCINA 2 (IL-2): Cuando se agregó la IL-2 a las células B estimuladas de los pacientes y controles se evidenció un efecto proliferativo; el efecto fue menos notorio que el producido por la IL-4r.

La diferencia entre los promedios de los tres grupos fue significativa ($F = 84.99$, $p < 10^{-6}$).

PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS

TABLAS III, IV (pág. 27,28) Y GRAFICAS III Y IV (pág.33,34)

EFFECTO DE DIFERENCIACION DE LOS SOBRENADANTES DE LOS LINFOCITOS T DE LOS SUJETOS SANOS Y LOS PACIENTES CON LEG ACTIVO E INACTIVO: Cuando se les agregaron los sobrenadantes de las células T de los individuos sanos, a las células B estimuladas con LEG activo como inactivo, se observó una mayor producción de IgG que del isotipo IgM, principalmente por las células B estimuladas de los pacientes que de los controles.

La diferencia entre los promedios de los tres grupos fue significativo, para la producción de IgG por las células B estimuladas ($F = 3778$, $p < 10^{-6}$); para la secreción de IgM ($F = 435.30$, $p < 10^{-6}$).

Así mismo, cuando se agregaron los sobrenadantes de las células T a las células B estimuladas de los pacientes con LEG activo e inactivo, se obtuvo una mayor concentración del isotipo IgG y menores valores de IgM.

Cuando se les agregaron los sobrenadantes de las células T de los sujetos con LEG inactivo a células B estimuladas, se encontró una diferencia significativa entre los promedios de los tres grupos, para la producción de IgG ($F = 6456$ $p < 10^{-6}$) y para el isotipo IgM ($F = 1030$, $p < 10^{-6}$).

Cuando se les agregaron los sobrenadantes de las células T de los sujetos con LEG activo a las células B estimuladas, hubo una diferencia significativa entre los promedios de los tres grupos, para la secreción de los dos isotipos ($F = 705.86$, $p < 10^{-6}$ para IgG) y para IgM ($F = 592$, $p < 10^{-6}$).

EFFECTO DE LA INTERLEUCINA 4 RECOMBINANTE (IL-4R) EN LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS: Cuando se les agregó la IL-4r a las células B normales estimuladas, se observó la producción de las dos clases de Igs (IgM e IgG) en concentraciones muy bajas en los pacientes con LEG activo e inactivo, la producción de ambas Igs fue mayor. Se encontró una diferencia significativa entre los promedios de los pacientes tanto activos como inactivos, comparado con los controles (para la IgM, $F = 899,14$, $p < 10^{-6}$) y para la IgG, $F = 1062$, $p < 10^{-6}$).

EFFECTO DE Diferenciación DE IL-4 RECOMBINANTE Y LA INTERLEUCINA 2 (IL-4R/IL-2): Cuando se agregaron las dos citocinas, a las células B en reposo y estimuladas de los tres grupos, se evidenció un efecto sinérgico efectuado por los dos factores. La diferencia entre los promedios de los tres grupos fue significativo para la producción del isotipo de IgM ($F = 99$, $p < 10^{-6}$) y para la inmunoglobulina IgG ($F = 551.92$, $p < 10^{-6}$).

EFFECTO DE DIFERENCIACION POR LA INTERLEUCINA 2 (IL-2): Cuando se agregó la IL-2 a las células B estimuladas, se produjo una secreción de inmunoglobulinas, mucho mayor para el isotipo IgG que de IgM, en los pacientes tanto activos como inactivos, en comparación con los individuos sanos.

La diferencia entre los promedios de los tres grupos fue significativo para el isotipo IgM ($F= 602$, $p<10(-6)$) y para IgG ($F=969.16$, $p<10(-6)$).

También se realizaron ensayos similares con las células B sin estímulo en los tres grupos estudiados. Cuando se les agregaron los sobrenadantes de individuos sanos y de los controles, IL-4r, IL- 4r / IL-2 e IL- 2, a diferencia de los resultados obtenidos en las células B estimuladas, en estas se obtuvo un efecto proliferativo mucho menor. Cuando se les agregó interleucina 2, y en las células B en condiciones basales, no se observó actividad proliferativa en las células B normales, pero si en las células B de los pacientes. Tabla II (pág. 26) y Gráfica II (pág. 32).

Con respecto a los experimentos realizados para ver el efecto de diferenciación en células B en reposo, se pudo observar que en las células B de los controles no se producía ningún isotipo de inmunoglobulinas en concentraciones apreciables, excepto cuando se les agregaron las dos citocinas (IL-4r/IL-2).

TABLAS V,VI (pág. 29,30) Y GRAFICAS V, VI (pág. 35,36).

TABLA I

PROLIFERACION EN LAS CELULAS B DE PACIENTES CON LEG Y CONTROLES

Células B estimuladas con SAC

SUJETOS	(n)	CB+SAC	SOBRENADANTE LINFOCITOS T			IL-4r	IL4r/IL2	IL-2
			Nles	LEI	LEA			
Pacientes con LEG: Activo	(5)	4349*	11678	14106	18920	16174	9198	5031
		915**	1126	770	2279	1481	1070	1212
Inactivo	(10)	2317 455	7709 1247	8882 1135	13866 1091	8606 775	7437 416	4510 482
Normales	(10)	1821 360	3436 309	5264 616	8637 1374	3431 386	2704 489	3453 632

*Promedio de CPM de la incorporación de timidina tritiada.
**Desviación estandar.

TABLA II

PROLIFERACION EN LAS CELULAS B DE PACIENTES CON LEG Y CONTROLES

Células B sin estímulo

SUJETOS	(n)	CB+MEDIO	SOBRENADANTE LINFOCITOS T			IL-4r	IL4r/IL2	IL-2
			Nles	LEI	LEA			
Pacientes con LEG: Activo	(5)	1942*	10010	10606	17266	14530	8010	4950
		887**	1778	1778	1219	1380	2456	880
Inactivo	(10)	940	5997	8606	12536	5504	8904	2390
		85	2426	1212	787	1207	1173	585
Normales	(10)	386	2453	4979	6705	2658	2107	1250
		200	632	923	1155	438	405	318

*Promedio de CPM de la incorporación de timidina tritiada.

**Desviación estándar.

TABLA III

EFFECTO DE DIFERENCIACION EN CELULAS B DE PACIENTES CON LEG Y
CONTROLES

Células B estimuladas con SAC

SUJETOS	(n)	CB+SAC	SOBRENADANTE LINFOCITOS T			IL-4r	IL4r/IL2	IL-2
			Nles	LEI	LEA			
Pacientes con LEG: Activo	(5)	11.73*	14.40	14.01	36.04	32.84	1553.00	914.00
		1.74**	1.45	3.92	4.07	2.83	244.59	104.36
Inactivo	(10)	11.43	12.68	18.23	30.24	28.99	1100.00	762.00
		1.03	1.43	1.59	1.04	2.71	234.35	53.60
Normales	(10)	0.09	2.55	3.22	5.60	1.29	90.01	25.00
		0.05	0.41	0.92	0.74	0.45	6.03	1.61

*Producción de IgM (ng/ml).
**Desviación estandar.

TABLA IV

EFFECTO DE DIFERENCIACION EN CELULAS B DE PACIENTES CON LEG Y
CONTROLES

Células B estimuladas con SAC

SUJETOS	(n)	CB+SAC	SOBRENADANTE LINFOCITOS T			IL-4r	IL4r/IL2	IL-2
			Nles	LEI	LEA			
Pacientes con LEG: Activo	(5)	23.19*	46.30	54.53	63.20	32.85	2303.00	1179.00
		6.49**	1.41	1.51	1.85	2.52	319.03	125.71
Inactivo	(10)	18.46	26.00	36.41	54.15	19.25	1723.70	884.40
		1.57	1.34	0.80	5.25	1.30	329.32	259.49
Normales	(10)	0.37	2.60	3.49	4.50	1.56	97.28	30.24
		0.08	0.74	0.52	0.53	0.13	1.97	1.04

*Producción de IgG (ng/ml).

**Desviación estandar.

TABLA V

EFFECTO DE DIFERENCIACION EN CELULAS B DE PACIENTES CON LEG Y
CONTROLES

Células B sin estímulo

SUJETOS	(n)	CB+MEDIO	SOBRENADANTE LINFOCITOS T			IL-4r	IL4r/IL2	IL-2
			Nles	LEI	LEA			
Pacientes con LEG: Activo	(5)	7.40*	13.54	14.79	30.20	12.30	1065.00	554.00
		1.45**	1.40	0.88	1.53	1.09	325.54	62.59
Inactivo	(10)	2.23	8.85	12.48	24.67	13.30	125.00	73.00
		0.82	1.06	0.86	1.09	0.91	2.88	2.58
Normales	(10)	0.05	0.12	0.79	1.60	0.08	61.00	1.50
		0.05	0.02	0.21	0.10	0.03	1.50	0.19

*Producción de IgM (ng/ml).
**Desviación estandar.

TABLA VI

EFFECTO DE DIFERENCIACION EN CELULAS B DE PACIENTES CON LEG Y CONTROLES

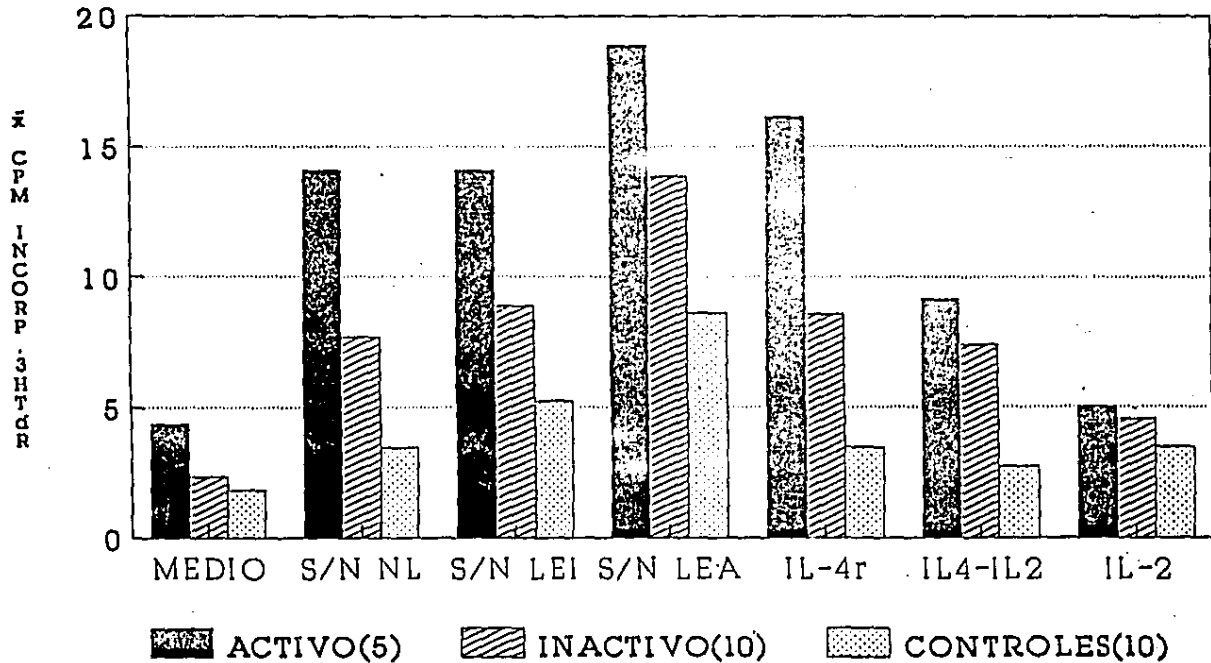
Células B sin estímulo

SUJETOS	(n)	CB+MEDIO			IL-4r	IL4r/IL2	IL-2
		Nles	LEI	LEA			
Pacientes con LEG: Activo	(5)	18.76*	39.20	44.42	32.10	2110.00	1248.00
		1.68**	0.79	1.09	2.37	260.38	64.20
Inactivo	(10)	12.77	17.07	37.63	13.78	725.00	665.70
		1.05	1.09	1.75	0.99	39.13	71.88
Normales	(10)	0.09	1.83	3.94	1.88	38.78	1.55
		0.03	0.22	0.73	0.22	1.55	0.27

*Producción de IgG (ng/ml).

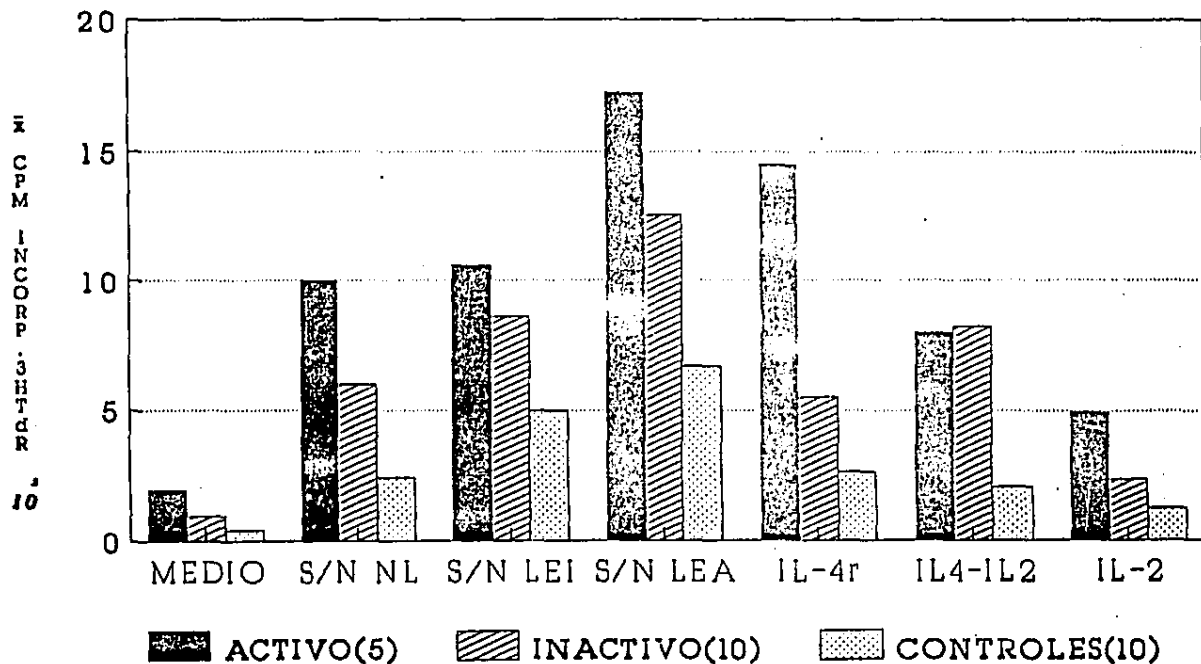
**Desviación estandar.

EFFECTO PROLIFERATIVO CELS. B CELULAS ESTIMULADAS CON SAC



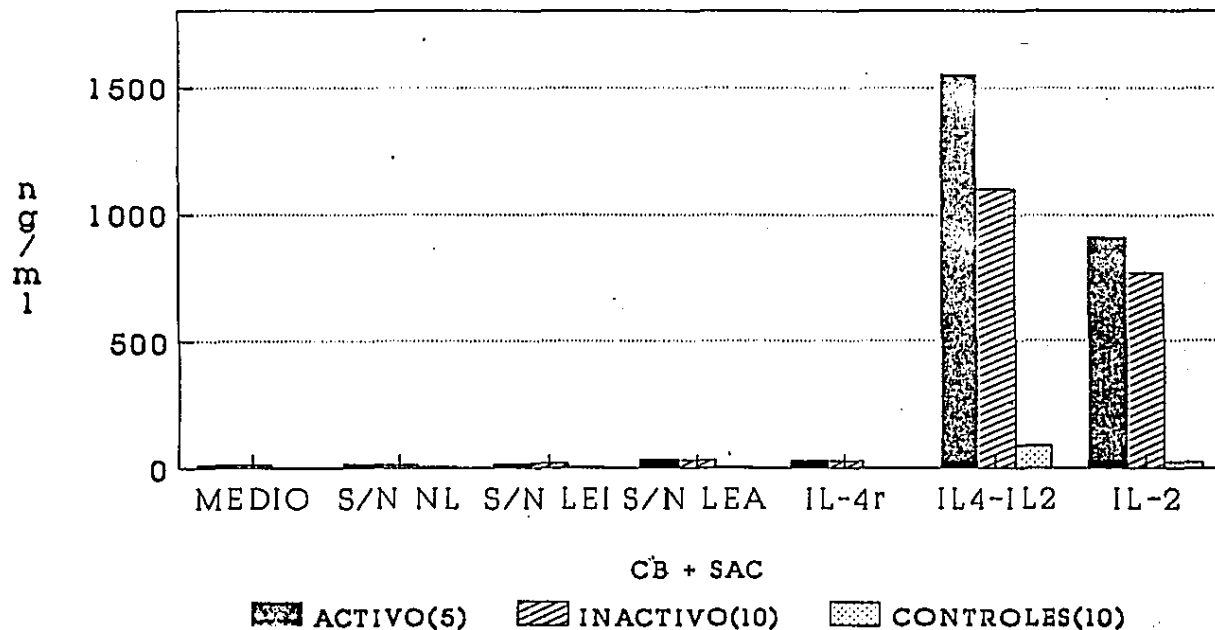
GRAFICA I

EFFECTO PROLIFERATIVO CELS. B CELULAS SIN ESTIMULO



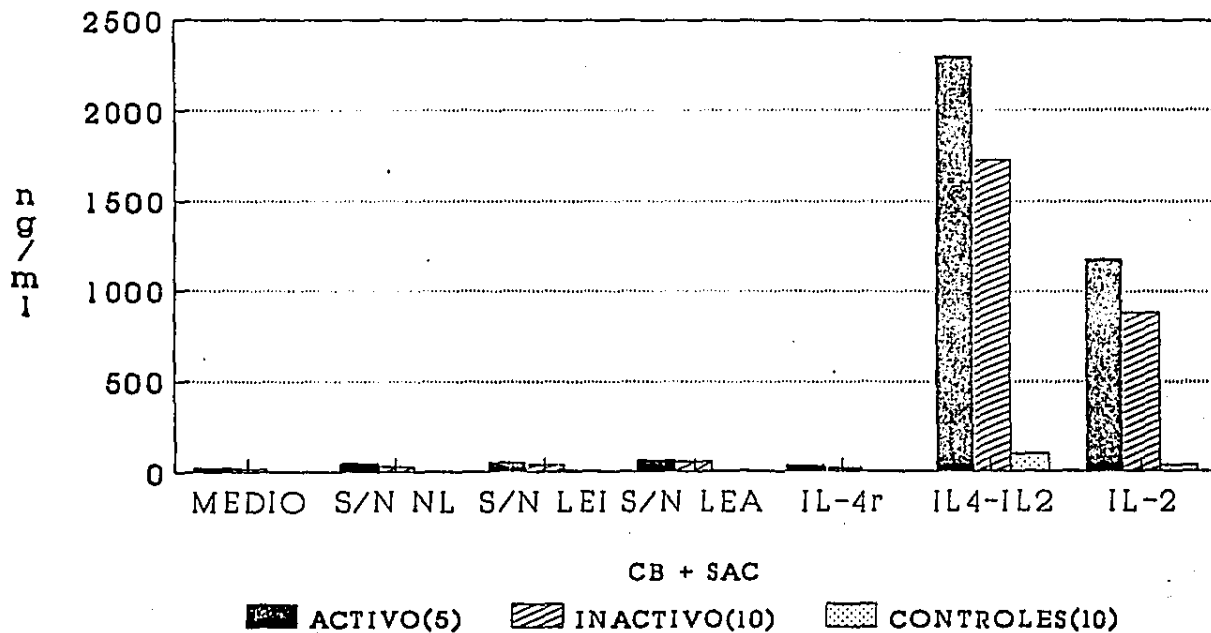
GRAFICA II

EFECTO SOBRE LA DIFERENCIACION PRODUCCION DE IgM



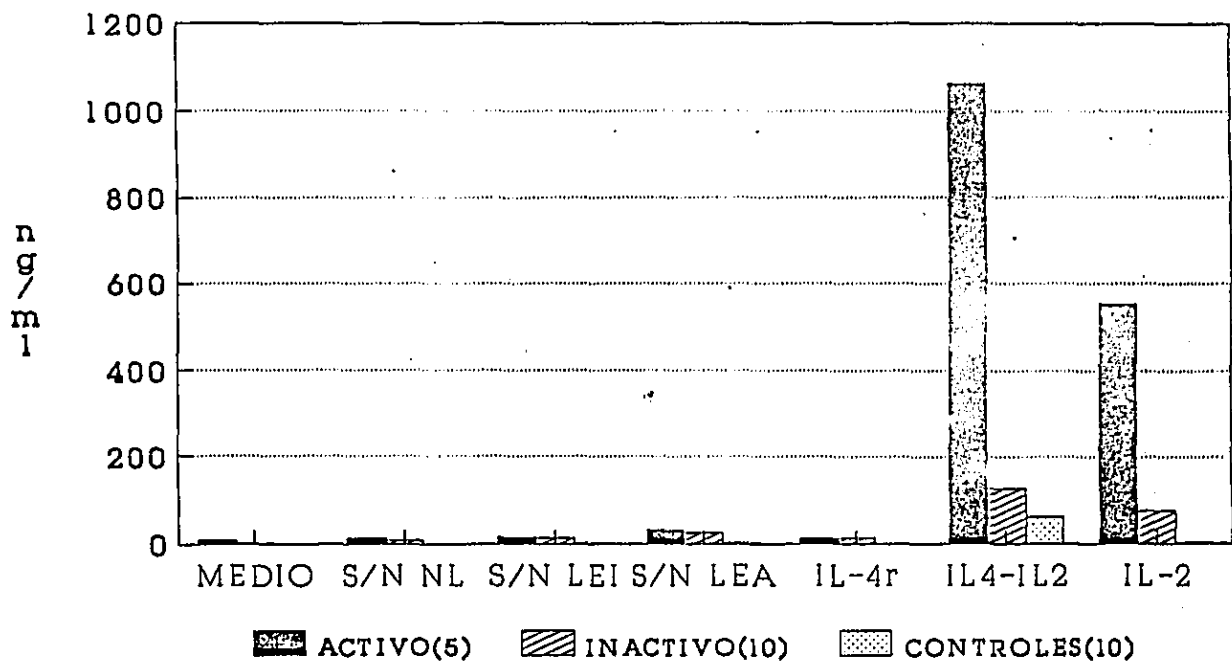
GRAFICA III

EFFECTO SOBRE LA DIFERENCIACION PRODUCCION DE IgG



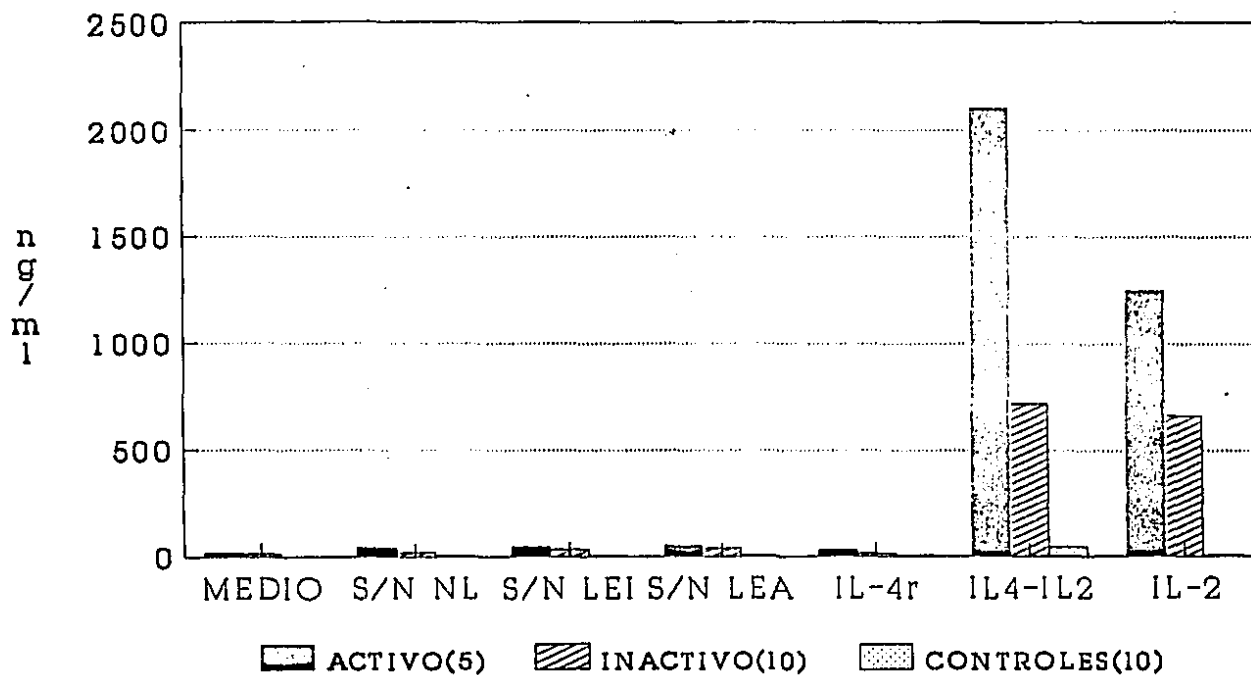
GRAFICA IV

EFFECTO SOBRE LA DIFERENCIACION PRODUCCION DE IgM



GRAFICA V

EFFECTO SOBRE LA DIFERENCIACION PRODUCCION DE IgG



GRAFICA VI

DISCUSION

Los factores de crecimiento y diferenciación producidos por los linfocitos T activados, se requieren para que las células B se activen, proliferen y secreten sus anticuerpos.

Se ha demostrado que las células B normales estimuladas con SAC producen sus propios factores de crecimiento; también, cuando son tratadas con anti-Igs o lipopolisacáridos bacterianos (LPS), incrementan la síntesis de proteínas y de ARN, aumentando su volumen celular (76-79).

Además, se ha demostrado que las células B de líneas celulares malignas son capaces de producir, su propio factor de crecimiento (80).

Estas evidencias apoyan que las células B normales al ser activados, son capaces de proliferar y diferenciarse, como lo hemos demostrado en este trabajo, ya que producen sus propios factores de proliferación y diferenciación.

En trabajos previos se ha demostrado que las células B de los pacientes con LEG activo e inactivo, producen sus propios factores de crecimiento y diferenciación cuando están en reposo y estimuladas, esto nos sugiere que dichas células B de los pacientes con LEG activo, están preactivadas y poseen receptores a los productos de estimulación. En este trabajo, las células B de los individuos con LEG inactivo están menos activadas y responden menos y las células B normales no estimuladas no responden.

Ya existen trabajos que demuestran este hecho, al observar la proliferación de linfocitos B más SAC en los sujetos con LEG (81). También hemos demostrado, con nuestros resultados que las células B en reposo y estimuladas de los sujetos con LEG activo o inactivo, producen sus propias Igs, principalmente del isotipo IgG y en segunda instancia la IgM.

Este hallazgo es apoyado por un trabajo realizado por Jasín y Ziff (82), los cuales demostraron la síntesis de Igs en células de sangre periférica, en los pacientes con LEG.

Nosotros no observamos efecto de diferenciación en los linfocitos B normales en condiciones basales, y en las que estuvieron bajo estimulación, las concentraciones de los dos isotipos medidos, fueron muy bajas.

Uno de los objetivos planteados fue comprobar el efecto de los sobrenadantes de las células T normales, con el propósito de observar el efecto de proliferación y diferenciación de la IL-4 cruda y comparar los resultados con los obtenidos cuando a las células B se les agregaba IL-4r.

Pudimos observar que en las células B normales en reposo, la IL-4 obtenida de los sobrenadantes tiene un efecto de proliferación, de igual manera que en las células B normales estimuladas.

Este efecto ya había sido descrito en trabajos anteriores, cuyos objetivos principales eran demostrar el efecto de activación en linfocitos B normales de la IL-4 de sobrenadantes (13-16).

En las células B en reposo y estimuladas de los pacientes con LEG,

cuando se les agregaron los sobrenadantes de las células T normales, se vió una actividad proliferativa mucho mayor en los pacientes activos que en los inactivos; así mismo, cuando se les agregó la IL-4r, el efecto de proliferación a que las condujo fue mucho mayor.

Esto podría sugerir que las células B de estos pacientes por estar hiperactivas, tienen mayor cantidad de receptores para la IL-4, respondiendo mejor al estímulo de este factor.

En otros trabajos, se ha encontrado, que los sobrenadantes de las células B tanto de individuos sanos como de los pacientes con LEG tienen actividad de IL-4, ya que incrementa la actividad proliferativa de las células T en presencia de dosis submitogénicas de FHA, induciendo además la expresión de CD23 en los linfocitos B normales (84, 24).

Basados en esto, consideramos que gran parte de las acciones descritas tanto para las células B normales como las de los sujetos con LEG en nuestro estudio, están dadas por la IL-4 que sumada su interacción con otras, posiblemente presentes en los sobrenadantes, nos aclaren las diferencias tanto en la proliferación como en la diferenciación en nuestros hallazgos.

Además, hay otros trabajos que apoyan estas observaciones, como el de Martínez-Cordero E. y cols. (73), cuyos resultados, no difieren en las conclusiones a nivel de los efectos de los factores de crecimiento y diferenciación de las células B, producidos por las células T. También, apoyan que las células B de los pacientes con LEG se hallan hiperactivos, un hecho muy importante en la alteración a nivel de la inmunorregulación en el LEG. Tanaka y Cols. (75), demostraron que estos factores que se producen en forma autócrina por las células B en los pacientes con LEG podrían contribuir a la hiperactividad de estos linfocitos produciendo los auto-anticuerpos. Aportan que podría tratarse de la IL-4, IL-5, IL-6 que actuarían en sinergismo en las fases de proliferación y diferenciación de las células B.

No se vió el efecto de diferenciación de los sobrenadantes de linfocitos T en las células B normales, pero si se observó en los pacientes activos con mayor producción de tipo IgG e IgM, siendo semejante el efecto en los pacientes con LEG activo.

El factor de proliferación que se obtuvo por la IL-4 de los sobrenadantes de las células T de los pacientes con LEG activo e inactivo, tuvieron un efecto de proliferación en las células B normales y mucho más cuando se les agregaron a las células B de los individuos con LEG activo e inactivo. Esto nos podría sugerir que los linfocitos T de estos pacientes, secretan en mayor cantidad ésta citocina, la cual hace que proliferen más y por ende, nuevamente el estado de hiperactividad de las células B de los pacientes conducen a un mayor efecto de proliferación y diferenciación produciéndose los auto-anticuerpos.

Es así como se pudo observar que los sobrenadantes de los sujetos tanto activos como inactivos, conducían a las células B normales estimuladas a producir sus propias inmunoglobulinas. La máxima proliferación, con la subsecuente producción de IgG se observó cuando se agregaron los sobrenadantes de las células T de los

pacientes, principalmente de los activos. Esto explica de alguna forma como se produce la hiperactividad de las células B en ésta patología, conduciendo a todas las manifestaciones clínicas, propias de una enfermedad autoinmune.

Se demostró también que la combinación de IL-4r/IL-2 producía un menor efecto proliferativo en las células B normales. Esto ocurrió de igual manera en las células B de los pacientes, principalmente los activos.

Recientemente se demostró que la IL-4, sobre la respuesta de las células B normales humanas, tiene un efecto inhibitorio. Se sabe que esta citocina, es una señal temprana en la activación y que regula en forma negativa la acción proliferativa pero, no la diferenciación de las células B (32,33).

Nosotros hallamos que al agregar la IL-4r/IL-2, se producía una menor proliferación en las células B de los pacientes, principalmente los que estaban activos, esto se podría explicar, por el hecho que sus células B estaban la mayoría de ellas en un estadio de diferenciación y no podrían diferenciarse.

Por otra parte se demostró un efecto sinérgico de estas dos citocinas, cuando realizamos los experimentos para la diferenciación de las células B.

El efecto de diferenciación de los sobrenadantes de las células T de los pacientes, se han podido adicionar a la IL-4, la acción de otros factores presentes en el mismo, como la IL-5, la IL-6, conocidos como factores de diferenciación. Estas citocinas interactuarían y se llevaría a cabo una mayor secreción de inmunoglobulinas en las células B de los pacientes.

Observamos, una mayor producción de IgG en las células B normales tanto sin estímulo como estimuladas y en menor escala se dió la producción de IgM. El mayor efecto para la secreción de IgG e IgM se observó en los pacientes activos.

Además, concluimos que la IL-2 no tuvo efecto proliferativo en las células B normales en reposo; en los pacientes con LEG activo e inactivo, tanto en condiciones basales como estimuladas, se observó una actividad proliferativa pero, mucho menor que la producida, cuando las células B fueron sometidas a los otros estímulos.

En las células B normales estimulados si hubo un efecto de diferenciación, siendo mayor la producción de inmunoglobulinas en los pacientes activos.

Con respecto a estos últimos resultados podemos recordar que la participación de todas estas interleucinas, es una red intrincada, en donde ellas van a cumplir sus funciones biológicas en diversas células blancas, principalmente las células B.

Normalmente, la IL-1 es un producto de secreción de los macrófagos bajo un estímulo antigénico determinado; este factor tiene efectos de amplificar las reacciones en la respuesta inmune, como la acción que desempeña sobre las células T cooperadores, para que estos se activen, proliferen y secreten una serie de mediadores solubles, entre ellos la IL-2. Este factor por un mecanismo autócrino activa a las células T y se secretan diversos factores, como son la IL-5, la IL-6, considerados esencialmente como factores de diferenciación, que actúan sobre las células B, para la producción

de anticuerpos.

El menor efecto proliferativo que observamos, al agregar la IL-2 en las células B de los pacientes, tanto en reposo como estimuladas son SAC, puede deberse a una alteración en los receptores para este mediador en las células B, como parte de las alteraciones en el circuito de inmunorregulación, apoyado por varias publicaciones donde demuestran que la producción y actividad de la IL-1 e IL-2 se encuentran disminuidos en los pacientes con LEG (72, 73).

Por otra parte, es posible que la mayoría de las células B de los pacientes con LEG ya se encuentren diferenciados y por ello no responden a una fuente exógena de IL-2.

La ausencia de efecto de la IL-2 las células B normales sin estímulo, es explicable ya que estas necesitan ser preactivadas, para que expresen sus receptores para la IL-2.

Podríamos ampliar lo demostrado en este trabajo, con relación al efecto de diferenciación de las células B de los pacientes con LEG, el cual fue más evidente que el efecto de proliferación, citando el trabajo realizado por Tanaka y cols, (75), quienes observaron que las células B de los pacientes con LEG, tuvieron una marcada producción de inmunoglobulinas, cuando a dichas células se les agregaba su propio sobrenadante. Concluyendo que las células B de dichos pacientes, secretan por sí mismos sus propios factores de crecimiento y diferenciación.

Podríamos hipotetizar, si agregáramos la IL-4 en combinación con la IL-5 o la IL-6, por el estado de hiperactividad de las células B sería mayor la secreción de inmunoglobulinas, que lo observado por nosotros cuando los estimulamos con la IL-4r/IL-2; es posible esta sugerencia ya que es bien conocido el efecto de estos factores en la diferenciación.

En el fenómeno de autoinmunidad que caracteriza al LEG, es relevante hacer notar, el estado de hiperactividad en que se hallan las células B de estos pacientes, y es así como se pudo evidenciar que aún sin ningún estímulo, los efectos de proliferación y diferenciación son marcadamente diferentes, como lo demostramos por los resultados observados en el análisis estadístico.

Las células B de estos pacientes por alteraciones intrínsecas de las mismas ó por un mecanismo aún sin aclarar, seguramente podrían poseer mayor número de receptores para la IL-4 y esto explicaría la mayor proliferación por parte de las células B, con relación a las observaciones en los sujetos sanos.

Así mismo, la producción incrementada de inmunoglobulinas, principalmente la IgG, es debido al estado de hiperactividad en que se encuentran las células B, la mayoría de las cuales están diferenciados.

Por otro lado, la producción incrementada de la IL-4 en los sobrenadantes de las células T de los pacientes, puede dar cabida a dos aspectos de discusión, en primera instancia la mayor secreción de éste factor puede propiciar un mayor estímulo, para las células B, considerando además, que pueden existir en estos sobrenadantes, otros factores que contribuyan a los efectos de diferenciación y proliferación. En segunda instancia, podría suceder que la actividad biológica de la IL-4, obtenida de los

sobrenadantes de las células T de los pacientes, sea más activa que la producida por las células T de los individuos sanos, incrementado la proliferación y diferenciación de las células B de los pacientes, en comparación con los resultados de los controles. El mejor conocimiento de este gran número de interleucinas nos conduciría indudablemente a una mejor explicación de la hiperactividad policlonal de las células B y la producción de auto-anticuerpos en los sujetos con LEG.

CONCLUSIONES

- Con relación a la metodología, para la producción de la IL-4 por los linfocitos T de individuos sanos, para considerarla como patrón para el estudio de la producción de éste factor en los pacientes con LEG, pudimos concluir que los sobrenadantes de las células T serían utilizados sin diluir y debían ser estimulados con ConA a una concentración de 2 μ gr/ml y posteriormente se incubarían a 37°C, para poder obtener los mejores resultados de estimulación de los linfocitos B, tanto de los controles como de los paciente. Así mismo, se estandarizó la concentración que debería ser utilizada de IL-4r y la IL-2.

Hallamos diferencias en los resultados obtenidos en la respuesta de las células B de los pacientes, en relación a los controles:

- Hubo una mayor diferenciación de las células B de los pacientes cuando les agregamos IL-4r y la combinación de IL-4r/IL-2, y un menor efecto de proliferación.

- Se observó un efecto sinérgico dado por la IL-4r/IL-2, produciéndose una mayor secreción de inmunoglobulinas, principalmente la IgG.

-Hubo un menor efecto de proliferación, y de diferenciación cuando las células B de los pacientes y controles fueron estimulados por la IL-2.

- Se encontró un incremento en la producción de la IL-4, principalmente por las células T de los pacientes activos y se observó que las células B de los pacientes al ser estimulados por los sobrenadantes de las células T de los mismos, se obtuvo un mayor efecto de proliferación y diferenciación.

Con relación a la respuesta de las células B a los diversos estímulos en los individuos sanos, concluimos:

- El efecto de proliferación de las células B, cuando se estimularon con los sobrenadantes de las células T de los pacientes, fue semejante al hallado con el estímulo de la IL-4r.

- Hubo una mayor proliferación de las células B cuando se estimularon con los sobrenadantes de las células T de los pacientes, principalmente los que padecían de LEG activo y se observó una respuesta proliferativa semejante cuando las células B fueron estimuladas con IL-4r/IL-2 y la IL-2 sólo.

- Con respecto a la diferenciación en las células B normales, no se encontró una producción de inmunoglobulinas en concentraciones considerables, cuando se sometieron a los diferentes estímulos,

excepto del efecto producido por la IL-4r/IL-2, donde sí se observó mayor producción de inmunoglobulinas, principalmente IgG.

ANEXOS:

Reactivos:

- Ficoll/Hypaque (FH)*
- Suero Bovino Fetal*
- Anti-Igs con fluoresceína*
- Medio de Cultivo RPMI-1640*
- Penicilina/estreptomicina*
- ConA*
- FHA*
- Timidina tritiada (New England Nuclear-Boston Mass)
- Fragmento F (ab): anti-IgG.*
- Tween 20 (BIORAD Laboratories - Richmond Calif).
- Anti-IgM ó Anti-IgG marcada con fosfatasa alcalina*
- P-nitrofenil fosfato*
- Acido sulfúrico (J.T Baker Analizaed Xalostoc - México).
- Anti-CD₃ ó OKT³ (sobrenadante de la línea celular CRL 814).
- Anti-OSB₂ ó OKB₇ (Ortho Diagnostic Systems Inc. Raritan - NJ).
- Complemento de Conejo (Peel freez - Brown Deer Wisconsin - USA).
- IL-4r (Genzime, Boston Mass.)
- IL-2 (Sobrenadante de la línea celular Jurkat).
- Antisuero HB-5 y HB-2 (Ortho Diagnostic Systems Inc. Raritan NJ).
- Azul tripano*

* Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA.

Solución PBS Preparación:

NaCl..... 15.3gr
Na₂HPO₄..... 7.6 gr
KH₂PO₄..... 0.125 gr
H₂O Destilada..... c.b.p 2 litros
PH (7.4)

Solución de Carbonato

NaHCO₃..... 2.1 gr
Na₂CO₃..... 0.53 gr
H₂O Destilada..... 60 ml
PH (9.5)

MATERIAL:

Cajas de petri (Crive - Vela Plastic S.A. México)
Microplacas de 96 pozos (Nunc Intermed, Kamstrup,
Denmark)
Filtros (0.22 mm Millipore Products division - Bed
Ford Ma.)

EQUIPOS:

Incubadora (37°C) (NARCO 4200)
Centrífuga (temperatura ambiente - DAMON/IEC DIVISION
CU-5000)
Centrífuga (temperatura 4°C- DAMON/IEC DIVISION
DPR-6000)
Microscopio de Inmunofluorecencia (Zeiss - West
Germany)
Congelador (-20°C - PHILIPS)
Congelador (-70°C - Revco Ultra low)
Espectrofotometro (Titertek multiskan)
Contador de Centello (Packard tri-carb modelo 3255)

BIBLIOGRAFIA

1. Bottomly Kim (1988). A functional dichotomy in CD4+T lymphocytes. *Immunol. Today* 9:268-273
2. Hamaoka T. y Ono S. (1986). Regulation of B cell differentiation. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 167-204.
3. Howard M., Farrar J., Hilfiker M. y cols. (1982). Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J. Exp. Med.* 155: 914-923.
4. Farrar J., Howard M., Fuller-Farrar J. y Paul W. (1983). Biochemical and physicochemical characterization of mouse B cell growth factor: a lymphokine distinct from interleukin 2. *J. Immunol.* 131: 1838-1842.
5. Swain S., Howard M., Kappler J. y cols. (1983). Evidence for two distinct classes of murine B cell growth factors with activities in different functional assays. *J. Exp. Med.* 185: 822- 835.
6. Dutton R. Wetzel G. y Swain S. (1984). Partial purification and characterization of a BCGF II from EL-4 supernatants. *J. Immunol.* 132: 2451-2456.
7. Vitteta E., Ohara J., Myers C. y cols. (1985). Serological biochemical and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J. Exp. Med.* 162: 1726-1731.
8. Miyajima A., Shoichiro S., Schreus J. y cols. (1988). Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T cell derived lymphokines. *Faseb* 2: 2462-2472.
9. Grabstein K., Eisenman J., Mochizuki D, y cols. (1986). Purification to homogeneity of B cell stimulating factor. *J. Exp. Med.* 163: 1405-1414.
10. Paul W. y Ohara J. (1987). B-cell stimulatory factor II/ Interleukin 4. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 429-459.
11. Rennick D., Yang G., Muller-Sieburg Ch. y cols. (1987). Interleukin 4 (B-cell stimulatory factor 1) can enhance or antagonize the factor-dependent growth of hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 84: 6889-6893.
12. King A., Wierda D. y Landreth K. (1988). Bone marrow stromal cell regulation of B-lymphopoiesis. The role of macrophage, IL-1, and IL-4 in pre-B cell maturation. *J. Immunol.* 141:2016-2026.

13. Broxmeyer H., Lu L., Cooper S. y cols. (1988). Sinergistic effects of purified recombinant human and murine B cell growth factor-1/IL-4 on colony formation in vitro by hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 141: 3852-3862.
14. Ohara J. y Paul W. (1987). Receptors for B cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage. *Nature* 325: 537-540.
15. Rabin E., Ohara J. y Paul W. (1985). B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2935-2939.
16. Defrance T., Vanbervliet B., Aubry J. y cols. (1987) B cell growth-promoting activity of recombinant human interleukin 4. *J. Immunol.* 139: 1135-1141.
17. Defrance T., Aubry J., Rousset F. y cols. (1987). Human recombinant interleukin 4 induces activated Fc receptors human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165: 1459-1467.
18. Coffman R., Ohara J., Bond M. y cols. (1986). B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.* 136: 4538-4541.
19. Lebman D. y Coffman R. (1988). Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulating clonal B cell cultures. *J. Exp. Med.* 168: 853-862.
20. Hudak S., Gollnick S., Conrad D. y cols. (1987). Murine cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) increases expression of the Fc receptor for IgG on mouse B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4606-4610.
21. Snapper C. y Paul W. (1987). B-cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 139: 10-17.
22. Defrance T., Vanbervliet B., Pene J. y Banchereau J. (1988). Human recombinant IL-4 induces activated LB lymphocytes to produce IgG and IgM. *J. Immunol.* 141: 2000-2005.
23. Snapper C., Finkelman F. y Paul W. (1988). Differential regulation of IgG1 and IgG synthesis by interleukin 4. *J. Exp. Med.* 167: 183-196.
24. Defrance T., Aubry J., Rousset B. y Banchereau J. (1987). Human recombinant interleukin 4 induces FcE receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165: 1459-2467.

25. Bonnefoy J., Aubry J. y Peronne C. (1987). Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgG: CD23 is a low affinity receptor for IgE. *J. Immunol.* 138: 2970-2978.
26. Bonnefoy F., Defrance T., Peronne C. y cols. (1988). Human recombinant interleukin 4 induces normal B cells to produce soluble CD23/IgE-binding factor analogous to that spontaneously released by lymphoblastoid B cell lines. *Eur. J. Immunol.* 18: 117-122.
27. Bartlett C. y Noelle J. (1987). A cell surface Elisa to detect interleukin 4 induces class II expression on murine B cells. *J. Immunol. Meths.* 105: 79-85.
28. Noelle R., Krammer P., Ohara J. y Uhr J. (1984). Increased expression of Ia antigens on resting B cells: An additional role for B-cell growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 6149-6153.
29. Rabin E., Mond J., Ohara J. y Paul W. (1986). Interferon- γ inhibits the action of B cell stimulatory factor (BSF-1) on resting B cells. *J. Immunol.* 137: 1573-1576.
30. Mond J., Carman J., Sarma Ch. y cols. (1986). Interferon- γ suppresses B cell stimulation factor (BSF-I) induction of class II MHC on B cells. *J. Immunol.* 137: 3534-3537.
31. Galizzi J., Cabrillat H., Rousset F. y cols. (1988). Interferon- γ and prostaglandin E2 inhibit IL-4 induced expression of Fc RII/CD23 on B lymphocytes through different mechanisms without altering binding of IL-4 to its receptor. *J. Immunol.* 141: 1982-1988.
32. Jelinek D. y Lipsky P. (1988). Inhibitory influence of IL-4 on human B cell responsiveness. *J. Immunol.* 141: 164-173.
33. Karray S., Defrance T., Merle-Beral y cols. (1988). Interleukin 4 counteracts the interleukin 2-induced proliferation of monoclonal B cells. *J. Exp. Med.* 168:85-94.
34. Boom H., Liano D. y Abbas A. (1988). Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. Effects of interleukin 4 and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 167: 1350-1363.
35. Defrance T., Vanbervliet B., Aubry J. y Banchereau J. (1988). Interleukin 4 inhibits the proliferation but not the differentiation of activated human B cells in response to interleukin 2. *J. Exp. Med.* 168: 1321-1337.

36. Karasuyama H., Rolink A. y Melchers F. (1988). Recombinant interleukin 2 or 5 not 3 or 4 induces maturation of resting mouse B lymphocytes and propagates proliferation of activated B cell blasts. *J. Exp. Med.* 167: 1377-1390.
37. Puerkenson J., Newberg M., Wise G. y cols. (1988). Interleukin 5 and interleukin 2 cooperate with interleukin 4 to induce IgG1 secretion from anti-Ig-treated B cells. *J. Exp. Med.* 168: 1175-1180.
38. Lebnan D. y Coffman R. (1988). The effects of IL-4 and IL-5 on the IgA response by murine peyers patch B cell subpopulations. *J. Immunol.* 141: 2050-2056.
39. Melchers F. (1986). Factors controlling the B-cell cycle. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 13-36.
40. Kishimoto T. y Hirano T. (1988). Molecular regulation of B lymphocyte response. *Ann. Rev. Immunol.* 6: 485-512.
41. Mizuguchi J., Beaven ., Ohara J. y Paul W. (1986) BSF-1 action on resting B cells does not require elevation of inositol phospholipid metabolism or increased Ca⁺⁺ intracellular. *J. Immunol.* 137: 2215-2219.
42. Cambier J. y Ransom R. (1987). Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 175-199.
43. Coggeshall K. y Cambier J. (1984). B cell-activation. Membrane posphatidylinositol hydrolisis. *J. Immunol.* 133: 3382-3386.
44. Mitchell L., Davis L. y Lipsky P. (1989). Promotion of human T lymphocyte proliferation by IL-4. *J. Immunol.* 142: 1548-1557.
45. Huli J., Shevach E., Mizuguchi J. y cols. (1987). B cell stimulatory factor 1 (IL-4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165: 157-172.
46. Mule J., Smith C. y Rosenberg S. (1987). Interleukin 4 can mediate the induction of lymphokine-activated killer cell activity directed against fresh cells. *J. Exp. Med.* 166: 792-797.
47. Fernández B., Krammer H., Diamanstein T. y cols. (1987). B cell-stimulatory factor 1 (BSF-1) promotes growth of helper T cell lines. *J. Exp. Med.* 164: 580-593.

48. Kupper T., Horowitz M., Lee F., Robb R. y cols. (1987). Autocrine growth of T cells independent of interleukin 2: Identification of interleukin 4 as an autocrine growth factor for a cloned antigen-specific helper T cell. *J. Immunol.* 138: 4280-4287.
49. Fernández B., Sanders M., Oliver K. y cols. (1986). Interleukin 4 mediates autocrine growth of helper T cells after antigenic stimulating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 9689-9693.
50. Lewis D., Prickett K., Lars A. y cols. (1988). Restricted production of interleukin 4 by activated human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 9743-9748.
51. Lichman A., Kurt-Jones E. y Abbas K. (1987). B cell stimulatory factor 1 and not interleukin 2 is autocrine growth factor some helper T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 84:824-827.
52. Pfeifer J., McKenzie D., Swain S. y Dutton R. (1987). B cell stimulatory factor I (IL-4) is sufficient for the proliferation and differentiation of lectin-stimulated cytolytic T lymphocyte precursors. *J. Exp. Med.* 166: 1464-1470.
53. Widmer M., Algres V., Sassenfeld H. y cols. (1987). Regulation on cytolytic cell populations from human peripheral blood by B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4). *J. Exp. Med.* 166: 1447-1455.
54. Brooks B. y Rees C. (1988). Human recombinant IL-4 suppresses the induction of human IL-2 induced lymphokine activated killer (LAK) activity. *Clin. Exp. Immunol.* 74: 162-165.
55. Gallagher G., Wilcox F. y Azzawi-al F. (1988). Interleukin-3 and interleukin-4 each strongly inhibit the induction and function of human LAK cells. *Clin. Exp. Immunol.* 74: 166-170.
56. Nagler A., Lanier L. y Phillips J. (1988). The effects of IL-4 on human natural killer cells. *J. Immunol.* 141: 2349-2351.
57. Fernández B., Sanders V. y Vitetta E. (1989). Interactions between receptors for interleukin 2 and interleukin 4 on lines of helper T cells (HT-2) and lymphoma cells (BCL1). *J. Exp. Med.* 169:379-391.

58. Hodgkin P., Bond M., Ogarra A. y cols. (1988). Identification of IL-6 as a T cell-derived factor that enhances the proliferative response of thymocytes to IL-4 and phorbol myristate acetate. *J. Immunol.* 141: 151-157.
59. Kupper T., Flood P., Coleman D. y Horowitz M. (1987). Growth of an interleukin 2/interleukin 4-dependent T cell line induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J. Immunol.* 138: 4288-4292.
60. Littman B., Dastran F., Carlson P. y cols. (1989). Regulation of monocyte/macrophage C2 production and HLA-DR expression by IL-4 (BSF-1) and Interferon- γ . *J. Immunol.* 142: 520-525.
61. Vercelli D., Jabara H., Bee-Wah y cols. (1988). Human recombinant interleukin 4 induces Fc R2/CD23 on normal human monocytes. *J. Exp. Med.* 167: 1406-1416.
62. Zlotnik A., Fisher M., Roehm N. y Zipori D. (1987). Evidence for effects of interleukin 4 (B cell stimulatory factor 1) on macrophage: enhancement of antigen presenting ability of bone marrow-derived macrophages. *J. Immunol.* 138: 4275-4279.
63. Mc. Innes A. y Rennick D. (1988). Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.* 167: 598-611.
64. Ralph P., Naokoiz I. y Rennick D. (1988). Role of interleukin 2, interleukin 4, and α , β , γ , interferon in stimulating macrophage antibody-dependent tumoricidal activity. *J. Exp. Med.* 167: 712-717.
65. Hamaguchi Y., Kanakura Y. y Fujita J. (1987). Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J. Exp. Med.* 165: 268-273.
66. Jabara H., Ackerman S., Vercelli D. y Geha R. (1988). Induction of interleukin-4-dependent IgE synthesis and interleukin-5-dependent eosinophil differentiation by supernatants of a human helper T-cell clone. *J. Clin. Immunol.* 8:437-445.
67. Ogarra A., Warren D., Holman M. y cols. (1986). Interleukin 4 (B cell growth factor II/eosinophil differentiation factor for preactivated murine B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5228-5232.

68. Sanderson C., O Garra A., Warren D. y Klaus B. (1986). Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: proposed name interleukin 4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 437-440.
69. Warren J. y Sanderson C. (1985). Production of a T cell hibrid producing a lymphokine stimulating eosinophil differentiation. J. Immunol. 54: 615-623.
70. Monroe J., Halder S., Prystowsky SM. y Lammie P. (1988). Lymphokine regulation of inflamatory processes interleukin-4 stimulates fibroblast proliferation. Cli.Immunol.Immunopath. 49: 292-298.
71. Defrance T., Vanbervliet V. Aubry J. y cols. (1989). Human interleukin 4 down-regulates the surface expression of CD5 on normal and leukemic B cells. Eur. J. Immunol. 19: 293-299.
72. Alcocer-Varela J., Laffon A. y Alarcón-Segovia D. (1983). Defective monocyte production of, and T lymphocyte response to, interleukin 1 in the peripheral blood of patients with Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 54: 125-132.
73. Alcocer-Varela J. y Alarcón D. (1982). Decreased production of and response to interleukin 2 cultured lymphocytes from patients with Systemic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 69: 1388-1392.
74. Martínez-Cordero E., Alcocer J. y Alarcón D. (1986). Stimulating and differentiation factors for human B lymphocytes in Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 65: 598-604.
75. Tanaka Y., Kazuyoshi S., Shirakawa F. y Yamashita U. (1988). Production of B cell-stimulating factors by B cells in patients with Systemic Lupus Erythematosus. J. Immunol. 141: 3043-3049.
76. Jurgensen C., Ambrus J. y Fauci A. (1986). Production of B cell growth factor by normal human B cells. J. Immunol. 136: 4542-4547.
77. Reuben J., Falkoff M. y Fauci A. (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: 97-102.
78. Defrance A., Raveche E. y Paul W. (1982). Frequency of B lymphocytes responsive to anti-immunoglobulin. J. Exp. Med. 155: 1523-1535.

79. Rabin E., Mond J., Ohara J. y Paul W. (1986). B cell stimulatory factor I (BSF-I) prepares resting B cells to enter S phase in response to anti-IgM and lipopolysaccharide. J. Exp. Med. 164: 517-530.
80. Ambrus J. y Fauci A. (1985). Human B lymphoma cell line producing B cell Growth factor. J. Clin. Inv. 75: 732-738.
81. Sawada S., Amaki A. y Amaki I. (1985). Impaired B cell proliferation by Staphylococcus Aureus Cowan I in patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 28: 1008-1015.
82. Jasin H. y Ziff M. (1975). Immunoglobulin synthesis by peripheral blood cells in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 18: 219-228.
83. Spits H., Yssel H., Arai K. y Cols. (1987). Recombinant interleukin 4 promotes the growth of human T cell. J. Immunol. 139 :1142-1146.