

03062

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y POSGRADO DEL CCH.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**"PARTICIPACION DE LA MOLECULA CD28 EN EN LA ACTIVACION**

**CELULAR DE LINFOCITOS T"**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA (INMUNOLOGIA).

PRESENTA LA: Q.F.B. CLAUDIA ALVARADO DE LA BARRERA.

ASESOR DE TESIS: DR. JORGE ALCOCER VARELA

CO-ASESOR DE TESIS: DR. LUIS LLORENTE PETERS.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1993



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 está 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

1. Introducción
- 1.1 Alteraciones en la respuesta inmune de pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado
- 1.2 Participación de la molécula CD28 en la respuesta inmune
- 1.21 Características de CD28
- 1.22 Papel de CD28 en la activación celular
- 1.23 Interacción de CD28 con el ligando B7/BB-1
- 1.24 Participación de CD28 en la producción de citocinas
- 1.25 Participación de CD28 en otras funciones celulares
2. Objetivos
3. Hipótesis
4. Material y métodos
- 4.1 Estudio de la proliferación celular y producción de IL-2 por linfocitos T en presencia de Ac anti-CD28
- 4.11 Ensayos de proliferación celular
- 4.12 Cuantificación de la producción de IL-2
- 4.2 Expresión de CD28 en la membrana celular de linfocitos T
- 4.3 Estudio de la transcripción de CD28
- 4.31 Extracción del RNA
- 4.32 Amplificación del plásmido
- 4.33 Northern Blot
5. Resultados
6. Discusión
7. Apéndice
8. Bibliografía

# PARTICIPACION DE LA MOLECULA CD28 EN LA ACTIVACION CELULAR

## DE LINFOCITOS T

### RESUMEN

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la producción de múltiples autoanticuerpos dirigidos contra moléculas ubicuas celulares (nucleares, citoplásmicas y de membrana). Además se han reportado múltiples alteraciones en la función de diversos componentes celulares del sistema inmune, aunque se desconoce si son causa o consecuencia de la enfermedad. Algunas de estas alteraciones son: hiperactividad de los linfocitos B, disminución en el número y función de los linfocitos T CD8, incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4 con fenotipo de activación DR<sup>+</sup> y un defecto en la producción y respuesta a IL-1 e IL-2.

Aparentemente las alteraciones en la respuesta inmune de pacientes con LEG se encuentran en múltiples niveles. El definir con precisión la fase de la respuesta inmune en la cual se llevan a cabo los eventos responsables del rompimiento de la tolerancia a lo propio, nos permitirá entender la patogenia del LEG.

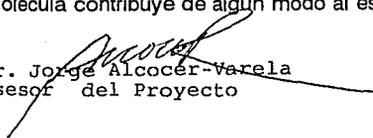
El mecanismo de activación y regulación de las células T es muy complejo, pero se sabe que mediante las moléculas que componen al receptor de células T (RCT) / CD3 se lleva a cabo el reconocimiento específico del antígeno y la subsecuente activación celular. Los linfocitos T presentan además moléculas accesorias en su superficie que funcionan como mediadores fisiológicos importantes en la respuesta inmune. Diferentes autores han propuesto que la participación de estas moléculas determina si la estimulación del RCT/CD3 conduce a las células a la activación, proliferación y secreción de citocinas, o al estado de anergia. Una de estas moléculas es el antígeno CD28, que se expresa aproximadamente en el 95% de los linfocitos T CD4 y en el 50% de los CD8.

La molécula CD28 es un homodímero transmembranral glicoprotéico de 44 kD. Al estimular a los linfocitos que expresan esta molécula con lectinas mitogénicas o antígenos, la costimulación mediada por CD28 amplifica la proliferación celular y producción de interleucinas tales como la IL-2, IL-3, GM-CSF, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Recientemente se encontró que la molécula B7, que está presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno, es el ligando natural para CD28. Esto indica que las interacciones mediadas por CD28 / B7 promueven el contacto entre linfocitos T y B.

Debido a la importancia de las señales transmitidas mediante CD28 en la regulación de la proliferación y la activación de linfocitos T, se ha pensado que CD28 y B7 son moléculas blanco en la inmuno intervención *in vivo*.

La estimulación de CD28 podría ser útil cuando la activación linfocitaria es deseable. En cambio el bloqueo de las interacciones CD28/B7 podría ser útil si lo que se busca es la inmunosupresión, por ejemplo en la prevención del rechazo a trasplantes o en la regulación de la respuesta inmune en enfermedades autoinmunes.

En este proyecto se analizó la participación de CD28 en la proliferación y producción de IL-2 de linfocitos T de pacientes con LEG y sujetos normales. También se estudió la transcripción de esta molécula y su expresión a nivel de proteína. Estos estudios se realizaron con el objetivo de estudiar la probable participación de la molécula CD28 en la compleja red de manifestaciones autoinmunes, y para definir si la participación de esta molécula contribuye de algún modo al estado clínico de los pacientes con LEG.

  
Dr. Jorge Alcocer-Varela  
Asesor del Proyecto

## INTRODUCCION

### ALTERACIONES EN LA RESPUESTA INMUNE DE PACIENTES CON LUPUS

#### ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG):

En el sistema inmune de los vertebrados participan diferentes estirpes celulares, que a grandes razgos pueden dividirse en la estirpe linfoide (linfocitos T y B) y la mieloide (plaquetas, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, mastocitos, macrófagos).

En condiciones de homeostasis, el receptor de células T (RCT) reconoce antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA). Las moléculas de superficie tienen una función mediadora en la presentación y reconocimiento antigénico. Las células CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos (Ags) unidos a moléculas del CMH clase II, y los linfocitos CD8<sup>+</sup> reconocen Ags asociados a moléculas clase I.

Las interacciones mediadas por el RCT son críticas para la estimulación de las células T, pero éstas por sí mismas no conducen a la activación celular. Para ello son necesarias otras interacciones celulares mediadas por las "moléculas accesorias", que conducen a las vías alternas de activación. Algunas de estas moléculas presentes en linfocitos T son CD8, CD4, CD2, CD11a y CD28. Los ligandos, presentes en CPA son las moléculas del CMH clase I y II, LFA-3, ICAM-1 y B7/BB-1 respectivamente. La falta de participación de estas moléculas podría conducir a los linfocitos T a un estado de anergia (1).

El LEG es una enfermedad autoinmune en la que participan diversos mecanismos patogénicos que afectan a diferentes tejidos. Numerosas anomalías se han identificado en el sistema inmune de estos pacientes, tanto a nivel humoral como celular. En el primer

caso, destaca la producción de auto anticuerpos (Acs) presentes en suero, los de mayor importancia diagnóstica son aquellos dirigidos contra componentes nucleares.

Estos Acs pueden ser divididos en dos grupos: el primero incluye aquellos dirigidos en contra de Acs presentes en varios órganos tales como los componentes nucleares y citoplásmicos. El segundo grupo de Acs incluye a los que son tejido específicos, es decir que reconocen eritrocitos, linfocitos, plaquetas, componentes celulares de hígado, tiroides, músculo, estómago y glándula adrenal por separado (2).

Los Acs antinucleares (AAN) se dividen en cuatro grupos: 1) los que reconocen DNA de doble cadena, 2) los que reconocen componentes expuestos por purina o pirimidina en el DNA de cadena sencilla, 3) los que reconocen histonas que son proteínas básicas presentes en el núcleo celular y 4) los que reconocen proteínas ácidas que forman complejos DNA o RNA. Los Acs dirigidos contra DNA de cadena simple o contra histonas se presentan aproximadamente en el 60 a 70 % de los pacientes con LEG (3).

Hasta la fecha no se ha precisado el papel patogénico de estos Acs, y su significado clínico no es de fácil interpretación puesto que pueden presentarse también en otras enfermedades del tejido conectivo.

Se sabe poco de los eventos necesarios para el rompimiento de la tolerancia a lo propio que conducen al desarrollo de enfermedades autoinmunes, pero se ha observado que los factores hormonales, ambientales y genéticos pueden participar en los mecanismos de autoinmunidad.

La respuesta inmune de los pacientes con LEG se caracteriza por hiperactividad de células B y por función disminuida de los linfocitos T y de las células no T, no B (4). La hiperactividad de las células B podría deberse a una activación directa e independiente de

linfocitos T, o bien, como resultado de la producción excesiva de factores de crecimiento y diferenciación para células B por parte de los linfocitos T reguladores (5).

La reducción en el número de linfocitos T en sangre periférica de estos pacientes probablemente sea secundaria a la presencia de Acs linfocitotóxicos que se producen contra estas células (6).

La presencia de linfocitos T activados en pacientes con LEG parece ser un hallazgo distintivo de las alteraciones de inmunoregulación en esta enfermedad. Los receptores para IL-2 se expresan en células T activadas, linfocitos B y macrófagos. Después de la activación celular, una fracción soluble del receptor de IL-2 es liberada por linfocitos T. En efecto, algunos laboratorios han encontrado un aumento de receptores solubles para IL-2 en pacientes con LEG (7).

En pacientes y en ratones con LEG se han encontrado diversas alteraciones funcionales de los linfocitos T, tales como la deficiencia en la producción y en la respuesta a IL-2 *in vitro* (8). También se ha encontrado que la respuesta T ante estímulos mitogénicos o ante Ags específicos está disminuída.

El suero de pacientes con LEG contiene dos grupos de IgG capaces de inhibir la producción de IL-2 por células T normales (9). El primer grupo puede ser adsorbido por una línea celular HLA-DR<sup>+</sup> pero no con una HLA-DR<sup>-</sup>, por lo cual parece inhibir la función de células accesorias. El otro Ac reconoce células T e inhibe su capacidad de producir IL-2 en respuesta a la estimulación con fitohemaglutinina (PHA) e IL-1. Aún no se ha definido el papel de las deficiencias en la producción de IL-2 en la patogenia del LEG. Se han encontrado anormalidades en la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-2 en individuos con LEG. Debido a que la IL-2 regula la expresión de sus propios receptores (10), algunos autores

han propuesto que los defectos en la expresión del receptor y la respuesta a IL-2 podrían ser secundarios al defecto en la producción de IL-2.

Tanaka y cols. (11) confirmaron que las células B de pacientes con LEG cultivadas *in vitro* sin estímulos, presentan mayor proliferación y producción de inmunoglobulinas. Estas respuestas son inhibidas por Acs dirigidos contra moléculas clase II del CMH y son amplificadas por estimuladores de linfocitos B. Estos datos sugieren que las interacciones entre linfocitos B probablemente tengan un significado importante en el desarrollo de las manifestaciones del LEG.

En contraste, esta hiperactividad de células B no se observa en la respuesta humoral ante la vacuna con virus de influenza o toxoide tetánico. La producción de Acs en estos pacientes ante la estimulación mitogénica con fitolaca americana (PWM) requiere de ayuda T, la cual se observa disminuida (12). Más aún, diferentes autores han propuesto que las células B no responden ante los inmunógenos debido a que han sido previamente activadas *in vivo*.

Se ha observado que la producción y respuesta a IL-1 es deficiente en pacientes lúpicos (13). Esta anomalía podría explicarse en parte por la acción de los inhibidores de IL-1. Los complejos inmunes unidos a receptores Fc en monocitos inducen la secreción de prostaglandinas y éstas también inhiben la producción de IL-1 (14).

El interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) controla la expresión de los genes del CMH e inhibe la proliferación linfocitaria. Esta linfocina bloquea la respuesta de células B al factor de crecimiento, pero induce su maduración. De modo que la producción deficiente de IFN- $\gamma$  en estos pacientes es probable que contribuya a las alteraciones observadas en las células B (15). Además en otros reportes se ha encontrado mayor producción de factores crecimiento que inducen diferenciación y proliferación de linfocitos B (16).

Se sabe que el reconocimiento antigénico está determinado por elementos del CMH y esta información ha puesto de relevancia la participación de factores inmunogenéticos en el desarrollo de una enfermedad autoinmune. En LEG, se ha descrito reiteradamente una asociación con los alelos HLA-DR2 y HLA-DR3 (17). Además, se ha encontrado una concordancia del 60% con LEG al estudiar gemelos genéticamente idénticos (18).

Los factores genéticos y hormonales parecen contribuir a la manifestación del LEG, pero no son los únicos factores responsables de este cuadro clínico. Por el momento, un gran número de preguntas en torno a la biología de los linfocitos y citocinas en LEG y otras enfermedades del tejido conectivo se encuentran sin respuesta. La relación causa - efecto entre las diferentes anomalías en la respuesta inmune de los individuos con LEG y los diversos factores ambientales no se ha definido.

## **PARTICIPACION DE LA MOLECULA CD28 EN LA RESPUESTA INMUNE**

Las alteraciones inmunológicas hasta aquí descritas anticipan ser sólo algunas de las implicadas en la patogenia del LEG. Debido a que las células T participan de manera cardinal en tales defectos de la regulación celular, en este trabajo se estudió la participación de la molécula CD28 en la activación de linfocitos T. El propósito es el de definir si esta glicoproteína transmembranal, su funcionamiento o algún defecto en su expresión, pudieran contribuir a integrar el complejo panorama inmunopatogénico del LEG.

### **Características de CD28:**

La molécula CD28 es una glicoproteína transmembranal de 88 -90 kDa constituida por dos glicopéptidos idénticos de 44 kDa unidos por puentes disulfuro, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los transcritos de RNAm que codifican para este antígeno son de tamaño variable (1.3, 1.5, 3.5 y 3.7 kb), pero todas estas secuencias comienzan con un palíndromo de 61 pares de bases (pb). La generación de los diferentes transcritos involucra dos eventos postranscripcionales. El par de transcritos más largos (3.5/3.7 kb) resulta de la utilización de una secuencia de poliadenilación, que conduce a la adición de 2167 pb antes del primer sitio de poliadenilación que utilizan las dos secuencias más cortas (1.3/1.5 kb). La diferencia de tamaño entre los transcritos de 1.3 y 1.5 o 3.5 y 3.7 se debe a un mecanismo de procesamiento alternativo que corta a 252 pb del exón que codifica para el dominio extracelular de la membrana. A pesar de que se han descrito estas cuatro especies de RNAm, hasta el momento sólo se ha identificado una forma de la proteína.

En humanos, CD28 normalmente se expresa en el 95% de los linfocitos T CD4+ y al menos en el 50 % de los linfocitos T CD8+ de sangre periférica (19).

En los órganos linfoides secundarios y en sangre periférica de ratones, todos los linfocitos T CD4+ y CD8+ expresan CD28. En el timo, la expresión de esta molécula es de 2 a 4 veces mayor en linfocitos inmaduros CD3<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>, en CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> y en CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. La función coestimuladora tan significativa de CD28 en células maduras, aunada a la gran expresión de esta molécula en linfocitos inmadura, sugieren que tiene un papel importante en la ontogenia de linfocitos T de ratones (20).

## **Papel de CD28 en la activación celular:**

La activación de linfocitos T requiere de una señal Ag específica transmitida por el complejo del receptor de células T (RCT) con las moléculas CD3. En tanto que el RCT regula la especificidad de la respuesta inmune mediada por células T, la presencia o ausencia de señales coestimuladoras regula la expresión genética de las linfocinas. La naturaleza de estas señales parece determinar también que un linfocito se active o adquiera un estado de tolerancia. Se ha propuesto que el estado de anergia puede ser el resultado del encuentro celular con el Ag en ausencia de señales coestimuladoras (21).

La activación celular involucra una serie de pasos que comienzan con el reconocimiento antigénico, seguido de los eventos que inducen la entrada al ciclo celular y la mitosis. La activación celular puede dividirse en tres partes: la primera requiere propiamente de las interacciones celulares. La segunda involucra señales transmembranales tales como la fosforilación y desfosforilación de proteínas, que regulan los eventos intracelulares producidos en respuesta a las señales extracelulares. La tercera parte incluye la subsecuente activación genética que induce a la producción de citocinas y otros productos requeridos para la proliferación y crecimiento celular.

Algunas de las formas habituales de activar a una célula son mediante el estímulo antigénico, el uso de forbol miristato acetato (PMA) o lectinas mitogénicas, o bien, con Acs monoclonales dirigidos contra el RCT/CD3. Al coestimular a una célula CD28<sup>+</sup> simultáneamente con Acs contra CD28, se observa un incremento en la proliferación celular y en la producción de ciertas citocinas, tales como IL-2, factor estimulador de colonias granulocítico monocítico (GM-CSF), IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (22).

Existen diversos argumentos para pensar que los mecanismos de activación inducidos por la estimulación de CD28 o de CD3/RCT son diferentes. La estimulación del RCT conduce a que la enzima tirosin-cinasa fosforile varios sustratos, entre ellos a la fosfolipasa  $C\gamma 1$ , lo cual genera segundos mensajeros que activan a la proteína cinasa C (PKC) e incrementan la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular. La activación mediada por CD28 difiere de la anterior en que no requiere de la participación de la PKC. Así, estas dos vías de activación son diferentes, pero sinérgicas.

Recientemente se confirmó que la vía de activación mediada por CD28 requiere de la elevación del  $Ca^{2+}$  intracelular (23). Se encontró que el estímulo de las moléculas CD5 ó CD28 con Acs monoclonales, conduce a la expresión del Ag de activación CD69 en linfocitos T. El tratamiento de estas células con agentes quelantes del  $Ca^{2+}$  o con inhibidores de tirosin cinasa inhibe la expresión de CD69. Estos resultados indican que los receptores CD28 y CD5 tienen capacidad de transmitir señales de manera Ag independiente.

Otro grupo de investigadores encontró resultados similares (24), pues confirmaron que el estímulo simultáneo de las moléculas CD5 y CD28 con Acs monoclonales inmovilizados conduce a la activación policlonal de linfocitos T. La estimulación de estas moléculas por separado no indujo proliferación celular. Se observó que este fenómeno es dependiente de IL-2.

La señal de transducción transmitida por el RCT requiere de la expresión de la fosfatasa de CD45, en tanto que CD28 puede funcionar independientemente de ésta. Las diferencias entre estas dos vías han sido confirmadas con agentes farmacológicos, puesto que la activación mediada por el RCT puede bloquearse con ciclosporina A o con agentes

que incrementan la concentración intracelular de AMP cíclico. En contraste, la activación mediada por CD28 es resistente a estos fármacos (25).

La producción de IL-2 en respuesta al estímulo de CD28 es sinérgica con la respuesta al ionóforo de calcio y ester de forbol. Esto es de particular importancia porque anteriormente se consideraba que las señales transmitidas por estos fármacos inducían la máxima respuesta en linfocitos T. Lo anterior corrobora que la vía de activación mediada por CD28 es distinta de la que emplea el RCT (26).

El papel de las vías de activación independientes de Ag en la respuesta inmune puede tener diferentes significados. En ciertos casos representa una forma de amplificación y mayor eficiencia de la respuesta inmune, mientras que en otros casos puede funcionar como un mecanismo mediante el cual las células se involucran de manera inespecífica y anárquica en dicha respuesta. Se observa activación celular independiente de Ag al estimular simultáneamente con Acs monoclonales contra CD2 y CD28 en presencia de IL-2 (27). También se ha logrado la inducción de receptores para IL-2 al estimular con Acs contra CD28 en presencia de IL-6 (28).

#### **Interacción de CD28 con el ligando B7:**

Recientemente se describió el papel de CD28 en las interacciones celulares entre linfocitos T y las células presentadoras de Ag (CPA) (29). La molécula B7, definida en la actualidad como el ligando de CD28, normalmente se expresa en linfocitos B activados y monocitos. También se ha encontrado en células B activadas con virus de Epstein-Barr y en linfomas de Burkitt (30,31). Debido a que esta molécula no se presenta en células en reposo, se piensa que los fenómenos de adherencia mediados por CD28 y B7 contribuyen

a mantener y amplificar la respuesta inmune, no a iniciarla. Esto es consistente con la función reguladora de CD28 en la producción de citocinas.

La importancia de las interacciones celulares mediadas por estas moléculas se comprobó con líneas celulares que normalmente no expresan B7. A dichas células (NALM-6) se les transfirió el gen que codifica para esta proteína, y de manera indirecta se les midió la eficiencia en la función de presentación antigénica. Se cultivaron células NALM-6 con linfocitos T, y se observó que la producción de IL-2 por éstos últimos tuvo una relación directa con la expresión de B7 por células NALM-6. Las células que no expresaron B7 fueron incapaces de inducir la producción de IL-2 por linfocitos T CD4<sup>+</sup> (32).

Otro grupo de investigadores describió la importancia de la interacción CD28 y B7 en la función citotóxica y en la respuesta alogénica de linfocitos T innaduros (33). Los autores encontraron que en estas células el estímulo del RCT/CD3 por sí solo resulta insuficiente para la inducción de una respuesta citotóxica o proliferativa. Mediante la transfección de B7 en líneas celulares que normalmente no expresan este Ag, se comprobó que la interacción entre CD28 y B7 es un evento fundamental en las respuestas antes mencionadas.

Tan y cols. (34) obtuvieron conclusiones semejantes, pues demostraron que al bloquear la interacción entre CD28 y B7 con Acs monoclonales, se induce una hiporrespuesta en linfocitos T ante la reestimulación antigénica.

La expresión de ciertas moléculas de activación celular frecuentemente se incrementa durante la inflamación crónica. En relación a este fenómeno, Sansom y cols. (35) estudiaron la expresión de B7 en células T, ya que éstas tienen la capacidad de presentar antígeno mediante la expresión de moléculas del CMH clase II. Los resultados de este trabajo indican que B7 se expresa en linfocitos T que han sido estimulados continuamente *in vitro*, pero no

en linfocitos en reposo. Probablemente las interacciones entre linfocitos T mediadas por B7 y CD28 sean de particular importancia para evitar el estado de anergia.

#### **Participación de CD28 en la producción de citocinas:**

El Ag CD28 funciona como un regulador de la activación, interviene en la transcripción genética de linfocinas y en la estabilización de RNAm que las codifica.

Se ha propuesto que la participación de CD28 resulta en una mayor secreción de citocinas debido a que estabiliza sus transcritos e incrementa la síntesis de éstos, con lo cual la producción de citocinas se torna de autócrina a parácrina (36,37).

Diferentes grupos de investigadores han logrado identificar una secuencia de 10 pb en el promotor de IL-2 que funciona como elemento de respuesta (CD28RE) a las señales transmitidas por CD28 (38). Civil y cols. demostraron que CD28RE es también la secuencia responsable de la respuesta a otras señales estimuladoras tales como las inducidas con PMA o Acs anti-CD3 (39); es decir, que diferentes estímulos convergen en la acción sobre CD28RE. Las mutaciones en esta secuencia conducen a la reducción de la respuesta mitogénica.

Williams y cols. (40) emplearon el hibridoma de células T Jurkat J32 para demostrar que en estas células la estimulación con Ac anti-CD28 es suficiente para inducir la secreción de IL-2. Este efecto puede amplificarse al coestimular con Acs anti-CD2 ó anti-CD3.

La molécula CD28 también es un regulador de la transcripción genética del factor estimulador de colonias-1 (CSF-1). Las células T activadas con Acs anti CD2 ó CD28 por separado no proliferan ni secretan esta citocina, pero la combinación simultánea de dichos

estímulos conduce a la acumulación de altos niveles de CSF-1 y a la secreción de la proteína biológicamente activa (41).

#### **Participación de CD28 en otras funciones celulares:**

La estimulación del RCT/CD3 con Acs monoclonales tiene como resultado un rápido incremento en la adherencia de linfocitos T mediada por las moléculas LFA-1 y VLA. Shimizu y cols. (42) demostraron que la estimulación simultánea de CD7 y CD28 con Acs monoclonales, o el tratamiento con ionóforo de  $Ca^{2+}$ , induce un rápido incremento en la adhesión mediada por fibronectina, ICAM-1 y VCAM-1.

Recientemente se describió un Ag de activación denominado CTLA-4. Este es un segundo receptor para B7, que a diferencia de CD28, únicamente se expresa en linfocitos T activados (43).

Linsley y cols.(44) demostraron que la estimulación simultánea de CD28 y CTLA-4 con Acs monoclonales, produce un efecto sinérgico en la inducción de proliferación de linfocitos preactivados. La molécula CTLA-4 regula de manera cooperativa con CD28 la adhesión y activación celular mediante las interacciones con B7.

Otros investigadores han demostrado que al interferir en la unión entre CD28 y B7 usando un Ac monoclonal contra CTLA-4, es posible la alorespuesta (45). De la misma forma se puede inhibir la respuesta primaria de Acs (46).

Hasta el momento no se ha logrado definir con precisión el papel de la células CD28<sup>+</sup> en la respuesta inmune puesto que la expresión de esta molécula puede inducirse, lo cual implica que las subpoblaciones CD28<sup>+</sup> y CD28<sup>-</sup> no están constituidas por células fijas (47).

## OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo es detectar las diferencias y semejanzas del papel de la molécula CD28 en la respuesta inmune de individuos con LEG y de sujetos sanos, por lo cual, los objetivos fueron los siguientes:

- 1) Medir la proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con LEG y de sujetos normales después de la estimulación con Acs Mo anti-CD3, o anti-CD3 + anti-CD28.
- 2) Cuantificar la IL-2 producida por linfocitos T de sangre periférica de pacientes con LEG y de sujetos normales en respuesta al estímulo con Acs Mo anti-CD3, o anti-CD3 + anti CD28.
- 3) Cuantificar la expresión de la molécula CD28 en la membrana celular de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> de sangre periférica mediante citometría de flujo en las células de los individuos antes mencionados.
- 4) Estudiar los transcritos de RNAm de CD28 en los linfocitos T de los mismos individuos mediante la técnica de Northern Blot.
- 5) Correlacionar los resultados obtenidos con la actividad clínica de los pacientes.

## HIPOTESIS

Ante el planteamiento de que la molécula CD28 es uno de los elementos que contribuyen a la anormalidad de la respuesta inmune de los pacientes con LEG, las hipótesis del trabajo fueron las siguientes:

1) La proliferación de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con LEG en respuesta a la estimulación con Acs Mo anti-CD3, o anti-CD3 + anti-CD28, difiere de la proliferación de linfocitos T de sujetos normales en respuesta a los mismos estímulos.

2) Al estimular linfocitos T de sangre periférica con Acs Mo anti-CD3, o anti-CD3 + anti-CD28, la producción de IL-2 por linfocitos de pacientes con LEG es diferente de la producción de esta citocina por linfocitos T de sujetos sanos.

3) La expresión de la molécula CD28 en la membrana celular de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> de sujetos sanos, es diferente de la expresión de esta molécula en linfocitos T de pacientes con LEG.

4) La expresión de RNAm específico para CD28 en los linfocitos T de pacientes con LEG difiere de la expresión de este transcrito en linfocitos T de sujetos sanos.

5) La proliferación de linfocitos T y la producción de IL-2 en respuesta al estímulo con Acs monoclonales anti-CD3 + anti-CD28, así como también la transcripción y traducción de CD28, correlacionan con el estado clínico de los pacientes con LEG.

## MATERIAL Y METODOS

### **Estudio de la proliferación celular y producción de IL-2 por linfocitos T en presencia de Ac anti-CD28:**

En esta parte se estudió un total de 10 pacientes con LEG sin tratamiento procedentes de la consulta externa del Departamento de Inmunología y reumatología del INNSZ. Todos los pacientes cumplieron con mínimo cuatro de los criterios de clasificación de la enfermedad del Colegio Americano de Reumatología (48). Simultáneamente se estudiaron 5 sujetos sanos. La mitad de los pacientes tenían la enfermedad en actividad y los demás se encontraban en remisión. Todos los individuos estudiados tenían entre 22 y 40 años. La duración de la enfermedad fue de 0.5 a 8 años, con un promedio de 6.8 años. En el momento del estudio ninguno de los pacientes estaba bajo tratamiento con corticosteroides o agentes inmunosupresores. La actividad clínica de la enfermedad fue evaluada con una escala de 1 a 16 puntos de acuerdo a los criterios del Mex-SLEDAI (49).

Se extrajeron células mononucleares (CMN) de sangre periférica heparinizada mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las CMN se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos (PBS) a 1400 rpm y se incubaron durante 2 hrs en cajas Petri a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, con la finalidad de separar los macrófagos en base a su capacidad de adherencia al vidrio. Posteriormente, las células no adherentes (linfocitos T y B) se incubaron durante 45 min a 37°C en columnas de 600 gr de nylon/lana. Al término de la incubación las células T fueron eluidas con medio de cultivo RPMI suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% a la misma temperatura.

**Ensayos de proliferación celular:** Se cultivaron  $10^5$  linfocitos T con RPMI + SBF en cajas de 96 pozos con dosis de  $1 \mu\text{g/ml}$  del Ac Mo 9.3 (50), dirigido contra la molécula CD28. Este Ac Mo fue donado por el Dr. R.A.W. Van Lier. En los mismos pozos se añadieron  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  del Ac Mo 64.1 (51), que reconoce al complejo CD3/RC1. Este Ac Mo fue una donación del Dr. P. Lipsky (Universidad de Texas, Dallas). La capacidad estimuladora del Ac Mo 64.1 se incrementa notablemente cuando éste se fija a la placa de cultivo, razón por la que dicho Ac se adsorbió a la caja de cultivo con una hora de anticipación a la siembra de las células. Los Acs antes mencionados se emplearon en dosis subóptimas para facilitar la observación del efecto coestimulador ejercido por ambos sobre los linfocitos T. Los cultivos celulares se hicieron en presencia y ausencia de IL-2. A los tres días de incubación, las células fueron marcadas con  $0.5 \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada ( $[^3\text{-H}]\text{dTdh}$ ). A las 18 hrs se recolectó el sobrenadante proveniente de cada pozo para cuantificar la producción de IL-2 y en las células se midió la proliferación mediante la incorporación de  $[^3\text{-H}]\text{dTdh}$ . La medición se efectuó en un contador de centelleo y se expresó en cuentas por minuto (CPM). Los cultivos se hicieron por triplicado, los resultados obtenidos representan el promedio obtenido.

La dosis de los Acs empleados se eligió en base a los estudios de dosis-respuesta. Las células se cosecharon a los tres días puesto que se observó que antes de este tiempo la respuesta fue pobre, y después del tercer día comenzó a decaer. Es decir que las técnicas se estandarizaron con dosis y tiempos de cultivo óptimos.

**Cuantificación de la producción de IL-2:** La IL-2 producida por los linfocitos T se cuantificó mediante bioensayo con células CTLL (52). Se empleó esta línea celular porque su capacidad proliferativa es dependiente de la actividad biológica y concentración de IL-2. La línea se obtuvo del American Type Culture Collection (ATCC).

Tres días antes del ensayo, las células CTLL se descongelaron y se cultivaron con RPMI-SBF 10%, con el sobrenadante proveniente de las células C63 (ATCC), productoras de IL-2 (concentración final=IL-2 al 20%). A los 3 días se lavaron y se ajustaron a una concentración de  $10^4$  células / pozo. Posteriormente se incubaron durante 24 hrs con 100  $\mu$ l de los sobrenadantes antes mencionados. Durante las últimas 8 hrs del cultivo se adicionaron 0.5  $\mu$  Ci de [ $^3$ -H]dTdh a cada pozo. La proliferación celular se midió en la forma antes mencionada. La conversión de proliferación celular (expresada en CPM) a unidades de IL-2 se realizó con ayuda de una curva estándar obtenida con IL-2 recombinante humana (Genzyme, Boston, Massachusetts). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Expresión de CD28 en la membrana celular de linfocitos T:**

El análisis de la expresión de CD28 en la membrana celular de linfocitos T se efectuó mediante citometría de flujo (53). Estos estudios se realizaron con la intención de detectar diferencias cuantitativas en la expresión de CD28 en las subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de los pacientes e individuos normales. El hecho de encontrar anomalías en la expresión de esta glicoproteína podría involucrar mecanismos transcripcionales o post-transcripcionales.

Se extrajeron CMN de sangre periférica de 6 sujetos sanos y 10 pacientes con LEG, de los cuales 5 tenían la enfermedad inactiva y 5 la tenían en actividad. En estas células se analizó la expresión de los siguientes marcadores de membrana de linfocitos T: CD3, CD4, CD8 y CD28. En un tubo con 10<sup>6</sup> CMN se cuantificaron las células CD3<sup>+</sup>, en otro tubo con el mismo número de células se cuantificaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> y en otro tubo se cuantificaron los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>.

Para la cuantificación de los linfocitos CD3<sup>+</sup> se empleó el Ac Mo OKT3 (IgG2a, ORTO, New Jersey) fluoresceinado. El procedimiento consistió en incubar 10<sup>6</sup>CMN con 15 µl del Ac por 30 min a 4°C y lavar las células a 4°C con PBS + suero de caballo al 1%. Este lavado se efectuó para eliminar el exceso de Acs que no se unieron a las células. La cuantificación de los otros marcadores se realizó de la misma manera. Se incubaron las CMN con 10 µl del Ac Mo anti-CD4 unido a ficoeritrina (IgG1, Becton Dickinson), enseguida se lavaron las células y se incubaron con 15 µl del Ac Mo anti-CD28 fluoresceinado (IgG1, AMAC). Para el estudio de la subpoblación CD8<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> se emplearon 10 µl del Ac Mo anti CD8 unido a ficoeritrina (IgG2a, Becton Dickinson). En todos los casos, después del último lavado las células fueron fijadas con formaldehído al 3%. Finalmente se analizaron en el citómetro de flujo (FACS Scan, Becton Dickinson).

### **Estudio de la transcripción de CD28:**

El estudio de la transcripción de este antígeno se efectuó con el objetivo de comparar los transcritos de CD28 en individuos normales y lúpicos. En caso de existir alguna diferencia en la expresión de dicha glicoproteína, mediante el análisis del RNA podría definirse si la alteración es a nivel transcripcional o *post-transcripcional*.

En esta parte del proyecto se estudiaron 12 pacientes con LEG, de los cuales 6 tenían la enfermedad en actividad y 6 se encontraban en remisión. Simultáneamente se estudiaron 6 individuos normales.

**Extracción del RNA:** Se extrajo RNA de  $10^7$  CMN de sangre periférica de cada sujeto estudiado. La extracción se llevó a cabo con la solución RNA zol, que contiene tiocianato de guanidina. Esta solución promueve la formación de complejos de RNA-guanidina-agua, e inhibe las interacciones hidrofílicas entre el DNA y las proteínas (54).

Se homogeneizaron  $10^7$  CMN con 2 ml de RNA zol. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo con agitación. La suspensión se incubó a 4°C durante 5 min y se centrifugó a 12000 g, 15 min a la misma temperatura. Se transfirió la fase superior a un tubo Eppendorf puesto que contenía el RNA en solución, y se desechó la fase inferior constituida por cloroformo, proteínas y DNA. Se añadió isopropanol a la fase acuosa en proporción 1:1 con el fin de precipitar el RNA. Esta mezcla se incubó por 15 min a 4° C y se centrifugó en las condiciones antes mencionadas. Se obtuvo el botón de RNA al fondo del tubo y se extrajo el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Finalmente se añadió etanol al 75% para lavar el botón de RNA, y se centrifugó a 7500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El RNA así obtenido se resuspendió en 15  $\mu$ l de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), se cuantificó con un espectrofotómetro y se congeló a -70°C hasta el momento de su utilización.

**Amplificación del plásmido:** En los ensayos de hibridación del cDNA específico para CD28 con el RNA extraído de los linfocitos T, se empleó la secuencia de cDNA de 1.5 kb insertada en el sitio de corte de Eco RI del vector PGEM-3Z. Dicho vector tiene una longitud de 2.4 kb, cuenta dos sitios de inicio de la transcripción y con diversos sitios de restricción. Las colonias transformantes son resistentes a la ampicilina y son de color blanco.

**Preparación de células competentes:** El plásmido se amplificó a gran escala en una cepa de *Escherichia coli*, para lo cual se hicieron precultivos de una colonia en 3 ml de medio Luria-Bertani (LB). Los tubos se incubaron por 10 hrs a 37°C con agitación. Posteriormente se diluyó el precultivo en 500 ml del mismo medio, y se creció el cultivo en las mismas condiciones hasta que se llegó a la fase log, ( $DO_{600} = 0.6$ ). Inmediatamente después se incubó en hielo para detener el crecimiento celular y se separaron las células mediante centrifugación a 4°C y 3000 rpm durante 10 min. El botón celular fue resuspendido en  $CaCl_2$  100 mM con agitación lenta y se centrifugó nuevamente. Las células competentes se resuspendieron en 3 ml del mismo reactivo y se conservaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

**Obtención de colonias transfectantes:** A 200  $\mu$ l de la suspensión con células competentes se les agregó 0.5  $\mu$ g del plásmido. Para facilitar la penetración éste en las células se indujo el choque térmico. Esto se logró con una incubación en hielo por 30 min, seguida del calentamiento a 42°C durante 2 min y otra incubación en hielo por 1 min. Las células así tratadas fueron sembradas en 800  $\mu$ l de medio LB y se incubaron 45 min a 37°C con agitación. Finalmente, se hicieron diluciones de la suspensión celular que fueron sembradas en cajas petri con agar LB en presencia y ausencia de ampicilina, 5-Br-4-Cl- $\beta$ -D-galactósido (X-Gal) e isopropil-tio- $\beta$ -galactósido (IPTG). Se seleccionaron las colonias

transfectantes por su color blanco y su capacidad de crecimiento en presencia de los reactivos antes mencionados.

**Crecimiento de las colonias transfectantes:** Una de las colonias transfectantes se sembró en 3 ml de medio LB con ampicilina y se incubó 12 hrs con agitación a 37°C. Los 3 ml con el inóculo se sembraron en 500 ml del mismo medio con cloranfenicol y ampicilina, el cultivo se incubó en las mismas condiciones. El crecimiento celular se detuvo incubando en hielo por 30 min.

**Purificación del plásmido:** Las células del cultivo fueron centrifugadas y se resuspendieron en un buffer con lizosima. Con el objeto de lisar la pared celular, se les indujo choque térmico mediante el cambio brusco de temperatura. Las células lisadas fueron centrifugadas y el sobrenadante se precipitó con LiCl e isopropanol a -70°C. El precipitado se separó por centrifugación a 12000 rpm, 20 min a 4°C y se lavó con etanol al 70%. Para eliminar el RNA presente en la muestra, se efectuó un tratamiento con RNAsa. El plásmido así amplificado se aisló mediante un gradiente de CsCl, que se formó al centrifugar por 3 hrs a 85 000 rpm. Se empleó bromuro de etidio para visualizar el halo formado por el plásmido. Por último, se le efectuaron dos extracciones con fenol/cloroformo y varias diálisis para eliminar las proteínas presentes y el bromuro de etidio.

**Northern Blot:** La detección de secuencias nucleotídicas del rRNA de CD28 se efectuó mediante Northern Blot (55). Para llevar a cabo esta técnica, se realizó el corrimiento electroforético del RNA en geles de agarosa al 1% con buffer desnaturizante. Se emplearon 20 µg de RNA de cada individuo. Cada muestra se desnaturizó a 65° C por 15 min con una solución desnaturizante. Las muestras fueron corridas con buffer de carga. Al finalizar el corrimiento, se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó el RNA con luz

ultravioleta. El RNA se transfirió a membranas de nitrocelulosa con buffer de transferencia durante 18 hrs y posteriormente se fijó a la membrana en un horno al vacío a 80°C durante 2 hrs. La membrana se prehibridó con buffer de hibridación durante 2 hrs y se hibridó por 18 hrs con la sonda específica para CD28, que previamente había sido marcada con  $^{32}\text{P}$ .

**Marcaje de la sonda:** La sonda se marcó con el método de Nick translation (56,57). Se tomaron 50 ng del plásmido y se digirieron con Eco RI para obtener por separado el inserto de cDNA específico para CD28. Se desnaturalizaron 25 ng de esta sonda mediante calentamiento a 95°C por 5 min. Se adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de dATP, 2  $\mu\text{l}$  de dGTP, 2  $\mu\text{l}$  de dTTP, 15  $\mu\text{l}$  de buffer con iniciadores, 5  $\mu\text{l}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (aproximadamente 50  $\mu\text{Ci}$ ), y se agregó agua hasta un volumen final de 49  $\mu\text{l}$ . Finalmente se añadió el fragmento Klenow y se incubó la mezcla por 1 hr a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 5  $\mu\text{l}$  de EDTA a pH=7 y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de buffer TE para incrementar el volumen final de la mezcla. Los 150  $\mu\text{l}$  resultantes se pasaron por una columna de Sephadex-G50 con el objetivo de desechar los fragmentos de DNA restantes y recuperar únicamente la sonda marcada con  $^{32}\text{P}$ . La sonda se eluyó de la columna mediante centrifugación a 1400 rpm y se diluyó en el buffer de hibridación con el cual se incubó la membrana de nitrocelulosa durante 18 hrs a 42° C.

Al finalizar el tiempo de hibridación, se lavó la membrana dos veces con SSC 2x a temperatura ambiente y dos veces con SSC 0.1x + SDS 0.1% a 50 °C.

La señal positiva se detectó mediante autoradiografía con papel X-OMat-AR y se cuantificó por densitometría.

## RESULTADOS

### Efecto del Ac anti-CD28 sobre la proliferación linfocitaria:

En la tabla 1 se muestra la respuesta proliferativa de los linfocitos T de los individuos normales y de los pacientes con LEG en presencia del Ac anti-CD3 al cabo de 3 días de cultivo. Se puede apreciar una mayor respuesta en las células de los pacientes con lupus, al compararla con la de los sujetos control. También se puede ver que al considerar el estado clínico de la enfermedad, dicho defecto fue más pronunciado en el caso de los linfocitos T de pacientes con lupus inactivo.

Al coestimular las células con Ac anti-CD3 y Ac anti-CD28, se observó un fuerte incremento en la respuesta proliferativa de los linfocitos de todos los sujetos estudiados (tabla 2).

Dicho aumento en la respuesta proliferativa fue mayor en los linfocitos de pacientes con la enfermedad activa que el obtenido con células de pacientes en remisión y con células normales. Si bien el promedio de este incremento de la respuesta proliferativa en presencia de anti-CD28 fue estadísticamente significativo al compararse con lo observado en las células normales, hubo una respuesta heterogénea en el grupo de pacientes con lupus. Si tomamos en cuenta el límite de confianza  $\Delta$ : 95% encontrado en el grupo normal [13.48 - 19.6], encontramos que 7 pacientes estuvieron por arriba de este límite, 3 con lupus activo y 4 con la enfermedad inactiva.

En todos los casos se observó una respuesta aún mayor al realizar los cultivos en presencia de IL-2. Nuevamente, la mayor respuesta se presentó en los linfocitos de pacientes con LEG.

Tabla 1  
**Respuesta proliferativa de linfocitos T de pacientes con LEG  
 y de controles sanos (cpm x 10<sup>-3</sup>)**

	T+anti-CD3	T + anti-CD3 + anti-CD28	T + anti-CD3 + IL-2	T+anti- CD3+anti- CD28+IL-2
LEG activos	73.21	10.796	7.721	31.227
	10.081	65.963	19.881	33.944
	4.300	10.910	4.602	17.935
	6.333	8.415	6.884	24.258
	12.651	105.175	10.483	106.913
	19.143	132.239	21.104	148.626
Promedio ± EE	9.971 ± 2.188	55.835 ± 22.112	11.779 ± 2.864	60.483 ± 22.068
LEG inactivos	2.425	7.205	11.806	37.879
	2.990	32.992	6.864	73.997
	6.690	25.697	50.950	73.055
	4.979	39.415	26.908	44.885
	32.717	10.286	47.696	116.692
	34.309	100.482	60.278	116.120
Promedio ± EE	14.018 ± 6.198	46.820 ± 13.593	34.083 ± 9.023	77.104 ± 13.77
Controles	4.523	18.774	11.633	21.376
	3.600	17.300	12.480	26.283
	4.210	18.140	13.917	25.240
	1.602	11.130	13.456	25.159
	5.455	18.555	17.627	29.690
	3.182	15.307	12.300	25.158
Promedio ± EE	3.672 ± 0.537	16.534 ± 1.196	13.568 ± 0.878	25.484 ± 1.087

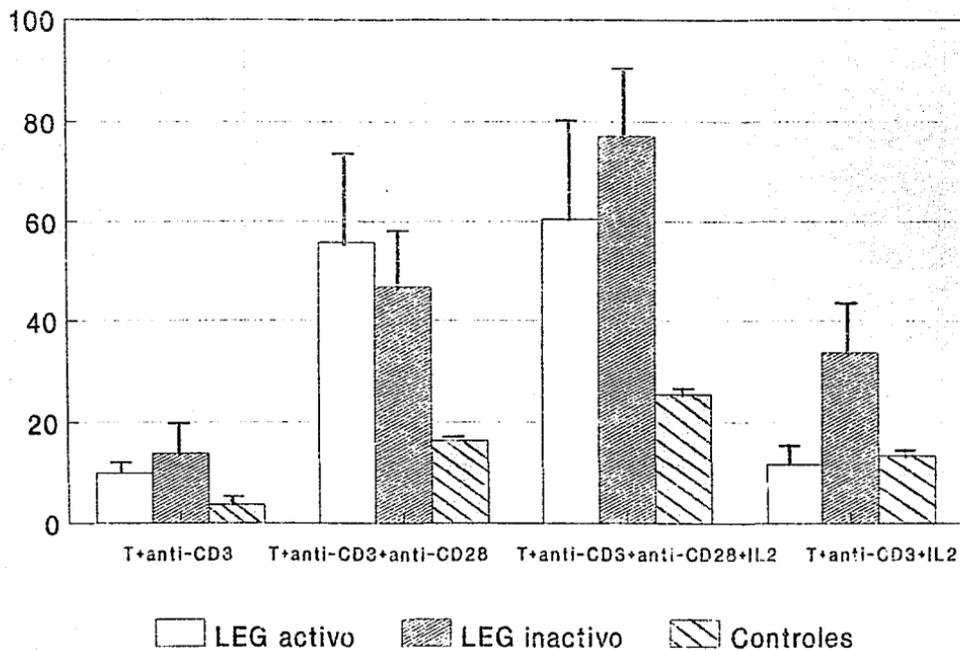
Las células T sin estímulo en todos los casos presentaron menos de  $2.6 \times 10^{-3}$  cpm. Los valores indican el promedio ± el error estándar (EE). En todos los casos  $p \leq 0.01$  vs controles.

Tabla 2

Promedios de los valores de respuesta proliferativa de linfocitos  
 T de pacientes con LEG y de controles sanos (cpm x 10<sup>-3</sup>)

	T + anti-CD3	T + anti-CD3 + anti-CD28	% Incremento
LEG ACTIVOS	9.971	55.835	459.97
LEG INACTIVOS	14.018	46.820	233.99
CONTROLES	3.672	13.568	269.49

## Respuesta proliferativa de linfocitos T (cpm X 10<sup>3</sup>)



Las barras representan el promedio de los valores individuales  $\pm$  el error estándar (EE).

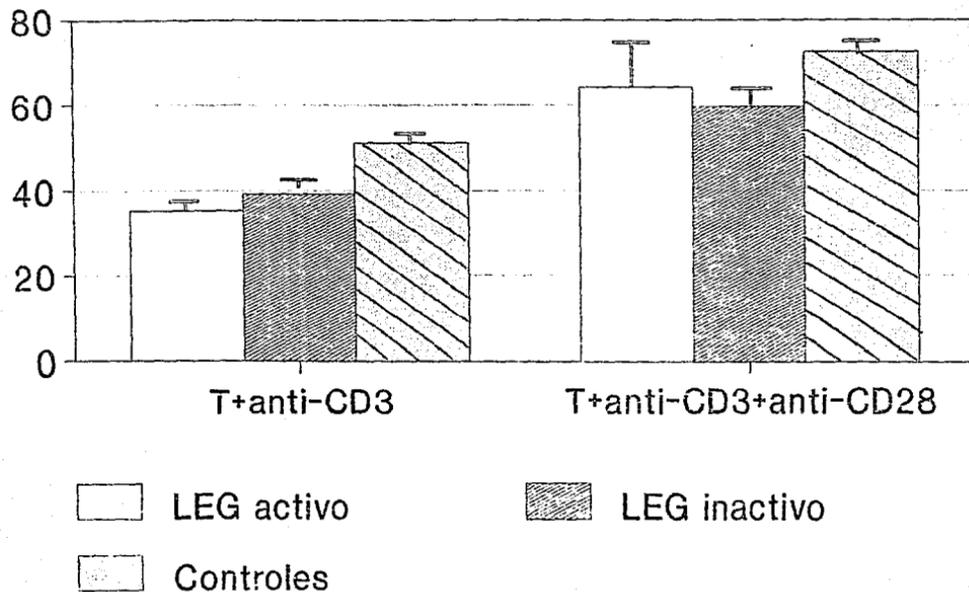
Tabla 3

**Producción de IL-2 por linfocitos T ( unidades / ml)**

	T + anti-CD3	T + anti-CD3 + anti-CD28
LEG ACTIVOS	38.2	63.6
	32.4	58.2
	40.6	71.3
	35.0	65.6
	30.4	62.0
<b>Promedio ± EE</b>	<b>35.32 ± 1.85</b>	<b>64.14 ± 2.16</b>
LEG INACTIVOS	40.6	51.1
	45.6	66.2
	38.5	54.9
	34.3	60.8
	37.3	65.1
<b>Promedio ± EE</b>	<b>39.26 ± 1.88</b>	<b>59.62 ± 2.91</b>
CONTROLES	48.5	64.8
	44.3	69.6
	53.8	68.3
	56.7	75.3
	51.6	84.5
<b>Promedio ± EE</b>	<b>50.98 ± 2.14</b>	<b>72.50 ± 3.44</b>

Al comparar la IL-2 producida por linfocitos de controles con la producida por linfocitos de lúpicos activos se obtuvo un valor de  $p = 1.837 \times 10^{-3}$ . En presencia de anti-CD28 los valores correspondientes no mostraron diferencias significativas.

## Producción de IL-2 por linfocitos T (unidades / ml)



Las barras representan el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  el error estándar (EE).

Tabla 4

**Promedios de los valores de producción de IL-2 por linfocitos T  
( unidades / ml)**

	T + anti-CD3	T + anti-CD3 + anti-CD28	% Incremento
LEG ACTIVOS	35.32	64.14	81.59
LEG INACTIVOS	39.26	59.62	51.85
CONTROLES	50.98	72.50	42.21

**Efecto de CD28 sobre la producción de IL-2:**

En la tabla 3 se observa que la producción de IL-2 por los linfocitos de pacientes con LEG ante el estímulo con Ac anti-CD3, fue menor que la obtenida por linfocitos de sujetos sanos. Esto está de acuerdo con lo reportado en la literatura. En los pacientes con la enfermedad activa esta deficiencia se vio más pronunciada.

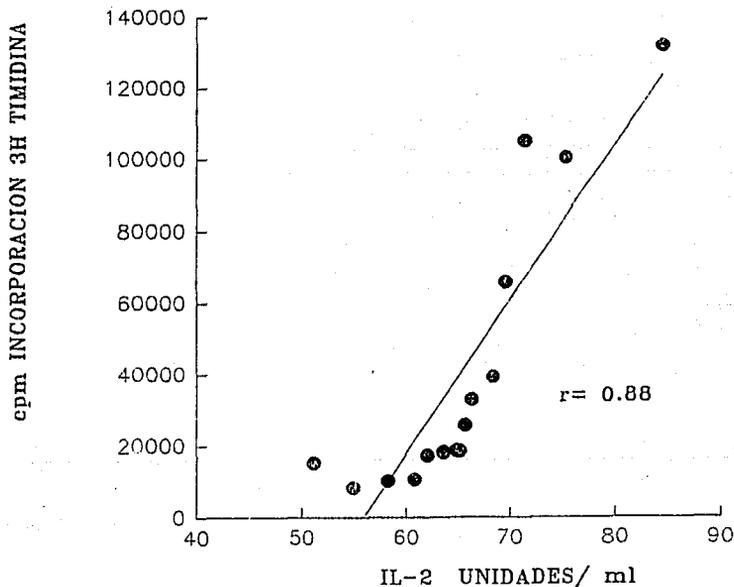
Al coestimar con el Ac anti-CD28, en todos los casos se observó un incremento en la secreción de IL-2.

En la tabla 4 se observa que el incremento en la secreción de IL-2 al cultivar las células en presencia de anti-CD28, fue mucho mayor en las células de pacientes activos. En promedio, hubo un 81.59 % de aumento en la producción de IL-2 en lúpicos activos, un 51.85% en pacientes inactivos y un 42.21% en controles sanos al comparar los niveles de producción en respuesta al estímulo por anti-CD3 o con anti-CD3 + anti-CD28. Los linfocitos de los pacientes mostraron una hiper-respuesta ante el estímulo con Ac anti-CD28.

A pesar de que la producción de IL-2 por linfocitos de sujetos sanos fue mayor, el incremento de esta respuesta en presencia de Ac anti-CD28 fue en promedio del 42.21 %, mientras que en los pacientes con lupus fue del 66.72 %.

## Correlación entre la respuesta proliferativa de células T y la producción de IL-2:

Con el fin de conocer la relación entre la respuesta proliferativa inducida mediante el estímulo de CD28 y la producción de IL-2 por las células de cada sujeto estudiado, se realizó un análisis de correlación lineal entre ambas mediciones. Se encontró una alta correlación tanto en las células de los pacientes con lupus como en las de los controles ( $r=0.88$ ).



**Fig.1** Correlación entre la respuesta proliferativa de células T (expresada en cpm) y la producción de IL-2 (expresada en unidades de IL-2). Ambos estudios se efectuaron en las mismas células.

Tabla 5

**Expresión de CD28 en membrana celular de linfocitos T de pacientes con LEG y sujetos normales**

	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	(%)	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	(%)
L.AC.	50.47	33.02	16.85	32.60	98.7	8.59	50.97
	81.27	35.7	28.21	34.2	95.79	17.81	63.13
	92.80	44.83	39.4	40.69	90.76	33.16	84.61
	12.42	5.76	4.68	5.09	88.36	2.99	63.88
	75.45	61.7	17.85	61.5	99.67	14.62	81.90
L.IN.	89.49	45.88	38.07	42.33	92.26	20.83	54.71
	79.55	44.78	25.74	44.63	99.66	17.82	69.23
	51.10	34.4	13.42	33.78	98.19	9.88	73.62
	78.35	48.24	18.11	47.82	99.12	8.96	49.47
	77.36	47.33	16.06	43.23	91.33	7.77	48.38
CONTR.	86.59	51.7	27.76	51.3	99.22	19.23	69.75
	80.08	47.42	34.21	42.12	99.3	26.27	76.79
	84.81	53.62	32.37	53.2	99.21	20.01	62.43
	83.96	43.73	39.56	43.26	98.92	28.34	71.63
	87.04	53.3	22.99	52.90	99.24	18.61	80.94
	85.08	58.05	29.57	56.3	96.98	16.80	56.81
	95.48	56.73	31.5	56.54	99.66	24.81	79.13

L.AC = lúpicos activos L.IN = lúpicos inactivos

Contr = Controles sanos.

Los valores representan el porcentaje de células que expresan cada molécula en un total de 1000 células registradas por el citómetro de flujo. El porcentaje (%) refleja el número de células CD28<sup>+</sup> del total de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup>.

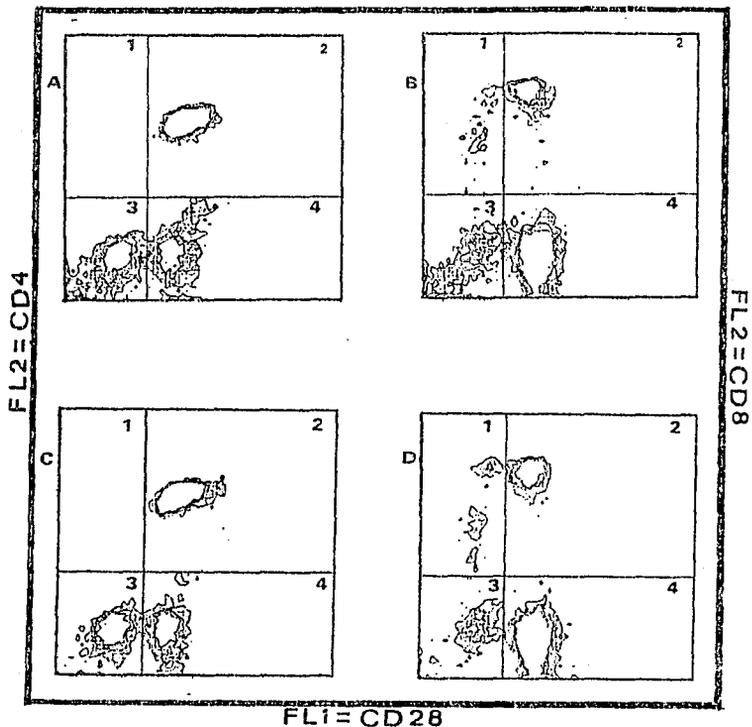
Tabla 6

**Promedios  $\pm$  EE de la expresión de CD28 en membrana celular de linfocitos T de pacientes con LEG y sujetos normales.**

	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	(%)	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	(%)
L. AC $\pm$	62.42	36.20	21.39	34.81 $\pm$	94.65 $\pm$	15.43	68.89
EE	$\pm 13.93$	$\pm 9.14$	$\pm 6.046$	9.04	1.89	$\pm 5.107$	$\pm 6.26$
L.IN $\pm$	75.17	44.12 $\pm$	22.28	42.35 $\pm$	96.11 $\pm$	13.05 $\pm$	59.08 $\pm$
EE	$\pm 6.395$	2.49	$\pm 4.44$	2.33	1.77	2.62	5.18
CONTR.	86.52	52.07	31.13	50.88	99.06	22.01	71.28
$\pm$ EE	$\pm 2.17$	$\pm 1.90$	$\pm 1.96$	$\pm 2.21$	$\pm 0.35$	$\pm 1.66$	$\pm 3.50$

**Expresión de CD28 en linfocitos T de pacientes con LEG y de controles:**

Al analizar los antígenos de superficie linfocitaria mediante citometría de flujo, se observó linfopenia T en los pacientes con lupus. Esta fue a expensas tanto de la subpoblación CD4<sup>+</sup> como de la CD8<sup>+</sup>, y en mayor proporción en los individuos con la enfermedad activa. La expresión de CD28 en ambas subpoblaciones se encontró disminuída en las células de los pacientes con lupus, como puede observarse en la tabla No 6, aunque dicha diferencia sólo fue estadísticamente significativa en las células CD8<sup>+</sup> que coexpresaban CD28 en su membrana. Al considerar el límite de confianza del 95% encontrado en el grupo normal, encontramos que 8 pacientes estuvieron por abajo de este límite, 4 con lupus activo y 4 con la enfermedad inactiva.



**Fig. 2.** Citofluorografía de flujo de células mononucleares de un paciente con LEG y de un individuo sano. En el cuadrante 1 de todas las gráficas se observan las células positivas para FL1. En el cuadrante 2 de las gráficas A y C, se observan las células T  $CD4^+ CD8^+$  de un paciente con LEG (44.63%) y las de un individuo sano (51.3%) respectivamente. En el cuadrante 2 de las gráficas B y D se observan las células T  $CD8^+ CD28^+$  del mismo paciente (17.82%) y del mismo control (19.28%). En el cuadrante 3 de todas las gráficas se observan las células negativas para FL1 y FL2. En el cuadrante 4 de todas las gráficas están las células positivas para FL2.

### Análisis de la transcripción de CD28:

Tabla 7

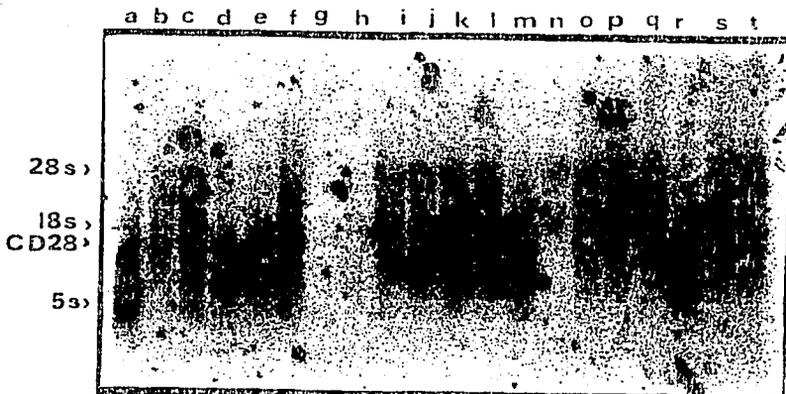
#### Cuantificación del RNA de CD28 en CMN de pacientes con LEG y controles sanos (Unidades relativas de densitometría):

	LEG activos	LEG inactivos	Controles
	168	89	110
	17	113	140
	50	166	110
	61	160	145
	80	145	210
		195	240
Promedio $\pm$ EE	75.20 $\pm$ 25.35	144.66 $\pm$ 38.27	159.16 $\pm$ 22.00

En la tabla 7 se observan los valores de las señales de hibridación del RNA de cada uno de los individuos estudiados con la sonda específica de cDNA para CD28.

Los linfocitos de pacientes con la enfermedad en actividad mostraron menor cantidad del transcrito de CD28 al compararlos con los valores de los sujetos control, con excepción de un paciente (DO=168). Los valores obtenidos en estos pacientes fueron muy heterogéneos. El análisis de la transcripción de la molécula estudiada en los pacientes con la enfermedad inactiva muestra valores ligeramente disminuidos con respecto a los controles.

Si tomamos en cuenta el límite de confianza del 95% encontrado en el grupo normal [102.61 - 215.71], encontramos que 5 pacientes estuvieron por abajo de este límite, 4 con lupus activo y 1 con la enfermedad inactiva.



**Fig.3.** Hibridación de RNA con cDNA específico para CD28. En los carriles se depositaron las siguientes muestras:

- a, b, c, d, e = RNA de CMN de pacientes con LEG activo.
- f = RNA de CMN de una paciente con LEG inactivo.
- g = RNA de transferencia de levadura (control negativo).
- h = nada
- i, j, k, l, m = RNA de CMN de pacientes con LEG inactivo.
- n = RNA de la línea celular HEP-2 (control negativo)
- o, p, q, r, s, t, = RNA de CMN de individuos sanos.

En todos los carriles se depositaron 20  $\mu$ g de RNA. La cuantificación de las señales positivas de hibridación se expresó en unidades relativas de densitometría, con el densitómetro Quick Scan, Helena Laboratories, Texas.

## DISCUSION

En este trabajo mostramos que la molécula CD28 participa en los mecanismos de activación linfocitaria que llevan a la proliferación de linfocitos T y a la producción de IL-2 por estas mismas células, en un sistema de estimulación *in vitro* con anti-CD3. Encontramos además, que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso generalizado tienen una respuesta diferente a la observada en células normales, al cultivarse en presencia de este anticuerpo. Los linfocitos T de pacientes con LEG respondieron en forma dependiente de su estado de actividad clínica, ya que presentaron una hiperrespuesta en los ensayos de proliferación y liberación de IL-2 cuando además de anti-CD3 se agregó anti-CD28. La posibilidad de que estas alteraciones fueran debidas a un cambio numérico en la expresión de CD28 en la superficie celular, pudiera explicarse en algunos pacientes, principalmente aquellos con enfermedad activa que en forma significativa tuvieron un menor porcentaje de células CD3 positivas para este antígeno de diferenciación.

En el lupus eritematoso generalizado se han encontrado diferentes alteraciones de la inmuno-regulación, tales como el desequilibrio numérico y funcional de las subpoblaciones de células T, la producción anormal de diversas citocinas (en especial IL-2), la ayuda defectuosa hacia las células B en la producción de autoanticuerpos y la expresión de antígenos de activación linfocitaria. Varias de estas alteraciones podrían explicarse por una alteración en la expresión y función de CD28, que podría ser a nivel transcripcional, como lo muestran los datos de análisis del RNA para esta molécula.

En diferentes trabajos se ha demostrado que este heterodímero regula la activación de linfocitos T, solo o en interacción con su ligando natural B7 expresado en diferentes células presentadoras de antígeno. Las señales que provee CD28 se han llamado

"secundarias" puesto que contribuyen con otras vías de activación, con el consiguiente aumento en la producción de citocinas y de la respuesta proliferativa. La señal coestimuladora transmitida mediante CD28 se observa en células previamente activadas mediante otras moléculas, tales como RCT/CD3, CD2, o CD5, aunque no se descarta que también participen moléculas como ICAM-1, ya que rápidamente aumenta la adhesión celular T mediada por integrinas.

La propuesta de que CD28 regula la respuesta inmune, pero no la inicia es congruente con el hecho de que su participación se observa en células previamente activadas. Podría pensarse que su expresión disminuida en linfocitos de pacientes con LEG desregula la respuesta linfocitaria, lo cual contribuye a la hiper-respuesta de proliferación y producción de IL-2 que se observó en este trabajo al coestimular con anti-CD28.

Schwartz y colaboradores (58) han propuesto que la presentación antigénica en ausencia de coestimulación de las células T conduce a la inactivación funcional o anergia clonal de células T y/o a la muerte celular. Esta teoría propone que los diversos caminos de coestimulación T determinan que una célula permanezca activa, se inactive o llegue a un estado de anergia. Aunque no se conocen las bases moleculares de esta coestimulación, se ha puesto gran atención sobre el papel de CD28 en el desarrollo de anergia clonal, debido a su papel central en la regulación de la producción de citocinas. La coestimulación con CD28 es parcialmente resistente a ciclosporina. En un trabajo previo (59) mostramos la clonación de una subpoblación T de pacientes con lupus, resistente a ciclosporina, productora de IL-3 y que en estudios recientes (datos no mostrados en este trabajo) encontramos que es CD28<sup>+</sup>. Estas células estimulan la proliferación y la producción de IL-2 en células T normales y de pacientes con lupus, efecto que también es resistente a ciclosporina.

Los resultados obtenidos en los estudios de proliferación celular, producción de IL-2, análisis de la transcripción de CD28 y cuantificación de esta molécula en la membrana celular, fueron semejantes entre los controles sanos y los pacientes con lupus inactivo. En la mayoría de los casos los valores obtenidos al estudiar linfocitos de pacientes con la enfermedad en actividad, no quedaron dentro de los intervalos de 95% de confianza obtenidos a partir de valores de sujetos sanos. En cambio un número mayor de pacientes con LEG inactivo pudo ser incluido en estos intervalos. Lo anterior demuestra que las respuestas celulares observadas en este trabajo guardan una estrecha relación con el estado clínico de la enfermedad.

El papel *in vivo* de esta molécula se desconoce. En base a los resultados de coestimulación, se piensa que CD28 y su ligando pudieran representar un nuevo blanco para inmunointervención, por ejemplo, en pacientes con enfermedades autoinmunes. La regulación de las señales disparadas por CD28 podría ser de utilidad en aquellos casos en que se necesitara frenar la producción de autoanticuerpos, como es el caso del lupus, o bien regular la acción de citocinas pro-inflamatorias.

**Reactivos:**

-Buffer desnaturizante 5x:

MOPS 0.1 M pH=7

Acetato de Na 40 mM

EDTA 5 mM pH=8

-Solución desnaturizante:

2  $\mu$ l buffer desnaturizante 5x

3.5  $\mu$ l formaldehído

10  $\mu$ l formamida

-Buffer de carga:

Glicerol 50%

EDTA 1 mM pH=8

azul de bromofenol 0.25%

xylene cyanol 0.25%

-Buffer de tanque:

Dilución 1:5 del buffer desnaturizante + H<sub>2</sub>O -DEPC

-Buffer de transferencia (SSC 10x):

NaCl 1.5 M

Citrato de sodio 0.15 M

-Buffer de hibridación (50 ml):

SSC 6x

Solución Denhardt 5 ml

SDS 0.5%

5 mg esperma de salmón

formamida 50%

H<sub>2</sub>O cbp 50 ml.

-Buffer TE:

Tris 10 mM pH=7.4

EDTA 0.1 mM pH=8, H<sub>2</sub>O

-Buffer PBS (1 litro):

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH=7

-Medio RPMI:

RPMI 1640

glutamina 2mM

penicilina 100U/ml

estreptomicina 1 µg/ml

-Sol. CsCl (50 ml):

12.5 ml de EDTA 0.5 M

47.9 g CsCl

10.2 ml H<sub>2</sub>O

-Sol. LiCl:

20 g LiCl

100 ml H<sub>2</sub>O

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Klein, J. Immunology. Blackwell Scientific Publications. London, 1990.
- 2) Mc Carty, D.J. Arthritis and allied conditions. 11<sup>th</sup> Ed. Philadelphia. Lea & Febiger, 1989.
- 3) Tan, E.M. Autoantibodies to nuclear antigens. The immunobiology and medicine Adv. Immunol. 1982. (33):167.
- 4) Decker, J.L; et al. Systemic Lupus Erythematosus: Evolving concepts. Ann. Intern. Med. 1979. (91): 587.
- 5) Inghirami, G; Simon, J; Balow, J.E; et al. Activated T lymphocytes in the peripheral blood of patients with Systemic Lupus Erythematosus induce B cells to produce immunoglobulin. Clin. Exp. Immunol. 1988. (6): 289.
- 6) Litvin, D.A; Cohen, P; Winfield, R.C. Characterization of warm-reactive IgG anti-lymphocyte antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and other soluble products. J. Immunol. 1983. (130): 181.
- 7) Rubin, L.A; Kurman, C.C; Fritz, M.E; et al. Soluble interleukin-2 receptors are released from activated human lymphoid cells *in vitro*. J. Immunol. 1985. (135): 3172.
- 8) Alcocer-Varela, J; & Alarcón-Segovia, D. Decreased production of and response to interleukin-2 production by cultivated from patients with Systemic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 1989. (69): 1386.
- 9) Miyagi, J; Minato, M; Sumiya, M; et al. Two types of antibodies inhibiting IL-2 production by normal lymphocytes in patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 1989. (32): 1356.
- 10) Malek, T.R. & Ashwell J.K. Interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone. J. Exp. Med. 1985. (161): 1575.

- 11) Tanaka, Y. & Shivakaua, F. Mechanism of spontaneous activation of B cells in patients with Systemic Lupus Erythematosus: analysis of the anti-class II antibody. J. Immunol. 1988. (140): 761.
- 12) Bobrove, A.M; & Miller, P. Depressed *in vitro* B lymphocyte differentiation in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 1977. (20) 1326.
- 13) Alcocer-Varela, J; Laffón, A; & Alarcón-Segovia, D. Defective monocyte production and T lymphocyte response to IL-1 in the peripheral blood of patients with Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 1985. (134): 3868.
- 14) Arend, W.P. Effects of immune complexes on production by human monocytes of IL-1 inhibitor. J. Immunol. 1985. (134): 3868.
- 15) Tsokos, G.C. Deficient  $\tau$ -IFN production in patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 1986. (29): 1210.
- 16) Alcocer-Varela, J; Martínez-Cordero, E; Alarcón Alarcón-Segovia, D. Excessive production and response to BCGF by cells from patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 1985. (28): 548.
- 17) Gibofsky, A. Disease associations of the Ia-like human alloantigens. J. Exp. Med. 1978. (148): 1728.
- 18) Arnett, F.C. Familial Systemic Lupus Erythematosus, the HLA system and the genetics of Lupus Erythematosus. *Lupus Erythematosus*, 3<sup>rd</sup> Ed. Edited by D.J. Wallace and E.L. Dubois. Philadelphia. Lea & Febiger, 1987.
- 19) Lee, P; C, Taylor; C; Petryniak, B; et al. The genomic organization of CD28. J. Immunol. 1990. (154): 344.
- 20) Gross, J.A; Callas, E. & Allison, J.P. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. J. Immunol. 1992. (149): 380.

- 21)** Steinman, R.M. & Young, J.M. Signals arising from antigen-presenting cells. Curr. Op. Immunol. 1991. (3): 361.
- 22)** Thompson, C.B; Lindstein, J.A; Ledbetter, J; et al. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell derived lymphokines/cytokines. Proc. Natl. Acad. Sci. 1989. (86): 1333.
- 23)** Vandenberghe, P; Verwilghen, F; Van Vaeck; et al. Ligation of the CD5 or CD28 molecules on resting human T cells induces expression of the early activation antigen CD69 by a calcium and tyrosine kinase-dependent mechanism. Immunology. 1993. (78): 210
- 24)** Verwilghen, J; Vandenberghe, P; Wallays, G; et al. Simultaneous ligation of CD5 and CD28 on resting T lymphocytes induces T cell activation in the absence of T cell receptor /CD3 occupancy. J. Immunol. 1993. (150): 835.
- 25)** June, C.H; Ledbetter, J; Linsley, P; et al. Role of the CD28 receptor in T cell activation. Immunol. Today. 1990. (11): 211.
- 26)** Björndahl, J.M; Sung, S; et al. Human T cell activation: differential response to anti-CD28 is compared to anti-CD3 monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol. 1989. (19): 881
- 27)** Pierres, A; Cerdan, C; López, M; et al. "CD3<sup>low</sup>" human thymocyte populations can readily be triggered via the CD2 and / or CD28 activation pathways whereas the CD3 pathway remains nonfunctional. J. Immunol. 1990. (144): 1202.
- 28)** Baroja, M; Ceuppens, J; Van Damme, J; et al. Cooperation between an anti-T cell (anti-CD28) monoclonal antibody and monocyte produced IL-6 in the induction of T cell responsiveness to IL-2. J. Immunol. 1988. (141): 1502.
- 29)** Linsley, P & Clark, E. T cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990. (87): 5031.

- 30)** Freeman, G; Freedman, A.S; Segil, J.M; et al. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. J. Immunol. 1989. (143): 2714.
- 31)** Yococh, T; Holly, R; et al. B lymphoblast antigen BB-1 expressed on Epstein-Barr virus activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. J. Immunol. 1982. (128): 823.
- 32)** Norton, S; Zukerman, L; Urdahl, K; et al. The CD28 ligand B7 enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. J. Immunol. 1992. (149): 1556.
- 33)** Azuma, M; Cayabyab, A & Bruck, D. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogenic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. J. Exp. Med. 1992. (175): 333.
- 34)** Tan, P; Anasetti, C; Hansen, J; et al. Induction of allogenic-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB-1. J. Exp. Med. 1993. (177): 165.
- 35)** Sansom, D; & Nicholas, D. B7/BB-1, the ligand for CD28, is expressed on repeatedly activated human T cells *in vitro*. Eur. J. Immunol. 1993. (23): 295.
- 36)** Lindsten, T; June, C; Ledbetter, J; et al. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T-cell activation pathway. Science. 1989. (244): 239.
- 37)** Linsley, P; Brady, W; Grosmarie, L; et al. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and IL-2 mRNA accumulation. J. Exp. Med. 1991. (173): 721.
- 38)** Fraser, J; Irving, B; Crabtree, G.R; et al. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. Science. 1991. (251): 313.
- 39)** Civil, A; Geerts, M; Aarden, L.A; et al. Evidence for a role of CD28 as a response element for distinct mitogenic T cell activation signals. Eur. J. Immunol. 1992. (22): 3041.

- 40)** Williams, T; Moolten, D; Makini, H; et al. CD28<sup>+</sup> stimulated IL-2 gene expression in Jurkat T cells occurs in part transcriptionally and is cyclosporine-A sensitive. J. Immunol. 1992. (143): 2609.
- 41)** Cerdan, C; Razanajona, D; Martin, Y; et al. Contributions of the CD2 and CD28 T lymphocyte activation pathways to the regulation of the expression of the colony-stimulating factor (CSF-1) gene. J. Immunol. 1992. (149): 373.
- 42)** Shimizu, Y; Gijls, A; Van Svanter, G,A; et al. Crosslinking of the T cell specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion. J. Exp. Med. 1992. (175): 577.
- 43)** Freeman, G; Lombard; D; Gimmi, C,D; et al. CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. J. Immunol. 1992. (149): 3795.
- 44)** Linsley, P & Greene, J. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. J. Exp. Med. 1992. (176): 1595.
- 45)** Lenschow, D,J; Zeng, J,R; Thistlethwaite, J,R; et al. Long term survival of xenogenic pancreatic islet grafts induced in by CTLA-4 Ig. Science. 1992. (257): 789.
- 46)** Linsley, P; Wallace, J; Johnson, J; et al. Immunosuppression *in vivo* by a soluble form of CTLA-4 T cell activation molecule. Science. 1992. (257): 792.
- 47)** Azuma, M; Phillips, J; & Lanier, L. CD28<sup>+</sup> T lymphocytes. J. Immunol. 1993. (150): 1147.
- 48)** Tan, E.M; Cohen, A.S; Fries, J.F; et al. The 1982 revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 1982. (25): 1271.
- 49)** Guzmán, J; Cardiel, M.H; Arce-Salinas, A; et al. Measurement of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. J. Rheumatol. 1992. (19): 1551.
- 50)** Weiss, A; Manger & Imboden, J. Synergy between the T3/antigen receptor complex and T<sub>p</sub>44 in the activation of human T cells. J. Immunol. (137): 819.

- 51) Amoroso, K. & Lipsky, P. Frequency of human B cells that differentiate in response to anti-CD3 activated T cells. J. Immunol. 1990. (145): 3155.
- 52) Clemens, M.J; Morris, A.G. & Bearing, A. Lymphokines and interferons. IRL Press. Oxford, 1987.
- 53) Batty, F.L. & Shortman, K. Flow cytometry and cell separation procedures. Curr. Op. Immunol. 1991. (3): 238.
- 54) Chomczynsky, P. The RNAzol™ B method. Cinna/Biotex Bulletin No. 3, 1989.
- 55) Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T. Molecular Cloning. 2<sup>nd</sup> Ed. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 56) Feinberg, A. & Vogelstein, B. 1983. Annals Biochem. (132): 6.
- 57) Feinberg, A. & Vogelstein, B. 1984. Annals Biochem. (137): 266.
- 58) Schwartz, R.H. Acquisition of immunologic self tolerance. Cell. 1989. (57): 1074.
- 59) Alcocer-Varela, J; Vidaller, J; Llorente, L; & Alarcón-Segovia, D. Presence of an IL-3 producing suppressor T cell resistant to cyclosporin A in the peripheral blood of patients with Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 1988. (73): 424.
- 60) Linsley, P; Ledbetter, J. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annu. Rev. Immunol. 1993. (11):191.