

00346
12
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

REGULACION DE LA FUNCION CITOTOXICA
POR INTERLEUQUINAS EN SUJETOS NORMALES
Y EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO
GENERALIZADO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :

BIOL. MARIA CRISTINA VELASQUILLO MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS,
DR. JORGE ALCOCER VARELA

México, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

RESUMEN

Con la finalidad de conocer la actividad citotóxica regulada por interleuquinas (IL) de las células no adherentes (NK CD56+) de los pacientes con lupus eritematoso generalizado, en el presente trabajo se estudiaron 24 pacientes que reunieron los criterios establecidos para esta enfermedad por el Colegio Americano de Reumatología, 15 de los cuales tenían datos clínicos de actividad y 9 estaban en remisión. Ningún paciente recibía tratamiento a base de antiinflamatorios no esteroideos, corticosteroides o inmunosupresores al momento del estudio.

Se obtuvieron células mononucleares (CMN) de sangre periférica de cada uno de los pacientes y del grupo control que estuvo formado por 14 mujeres normales. Las CMN se depletaron de monocitos por adherencia al plástico y se realizó tinción de inmunoperoxidasa de las células no adherentes (NA) para verificar que tuvieran menos del 1% de monocitos. Las células NA de los pacientes y del grupo control se incubaron por 18 hrs en presencia de suero autólogo y de suero bovino fetal descomplementados junto con las siguientes interleuquinas recombinantes: IL2 (0.5µg/ml); IL4 (100 UI/ml); IL6 (5 UI/ml); TNF (200 UI/ml), IL2 (0.5µg/ml) + IL4 (100 UI/ml); IL2 (0.5µg/ml) + IL6 (5UI/ml); IL2 (0.5µg) + TNF (200 UI/ml); IL4 (100 UI/ml) + IL6 (5UI/ml); IL4 (100UI/ml) + TNF (200 UI/ml); e IL6 (5 UI/ml) + TNF (200 UI/ml). Las dosis fueron establecidas por ensayos de proliferación en células dependientes.

Después de incubadas las células NA en presencia de las diferentes citocinas se realizaron ensayos de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr, frente a la línea celular K562 sensible a células asesinas naturales (NK), calculando así el porcentaje de lisis específica para cada una de las condiciones. Además se determinó por citometría de flujo el número de células NK CD56+ de cada uno de los ensayos.

No se encontró diferencia en la actividad citotóxica entre los pacientes lúpicos con enfermedad inactiva y el grupo control, pero sí fué menor en los pacientes con lupus activo. En presencia de suero autólogo ningún grupo mostró diferencia en su actividad NK (aNK) respecto a su basal. La IL2 incrementó la función citotóxica de los tres grupos. Mientras que la IL4, la IL6 disminuyeron la aNK de los controles y los pacientes con LEG inactivo, no así en los activos. El TNF provocó un descenso en la aNK respecto a su basal en siete de los nueve pacientes con LEG inactivo y no tuvo efecto sobre la aNK del grupo control y la de los pacientes con LEG activo. Cuando se realizaron las combinaciones de IL2+IL6 y de IL2+TNF se encontró aumento de la aNK tanto en el grupo control como en los pacientes; ésto cuando se comparó la condición basal contra la estimulada, no así cuando se comparó con la actividad lograda por estímulo con la IL2 sola. Mientras que la IL4 inhibió la aNK inducida por IL2.

La combinación de IL4+TNF no afectó la aNK mientras que la de IL4+IL6 en los controles y en los pacientes con LEG inactivo, dicha actividad disminuyó, aunque en cinco de ocho pacientes con LEG activo la aNK en las mismas condiciones aumentó respecto a la basal.

Solo en el grupo control y en el de los pacientes con LEG inactivo la IL6+TNF ejercieron un efecto inhibitorio sobre la nNK, ésto al compararse con la condición basal.

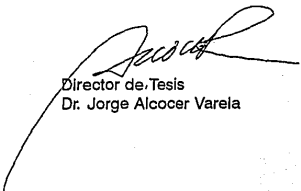
El análisis de la aNK entre los grupos mostró que la de los pacientes activos fué menor que la del grupo control y la de los pacientes inactivos, ya fuera en condiciones basales o estimuladas, lográndose restablecer a la normalidad en presencia de IL2 sola o en sus diferentes combinaciones.

Los pacientes con enfermedad inactiva se comportaron de manera similar al grupo control ya fuera cuando las células efectoras se cultivaron en presencia de las ILs solas o combinadas.

No hubo diferencia en el número de células no adherentes CD56+ (NK) entre los pacientes y controles.

Estos datos sugieren que existen mecanismos de regulación entre las diferentes interleuquinas y aunque los pacientes activos tienen una aNK menor, el comportamiento frente a ellas fué semejante, de tal manera que pueden responder a diferentes estímulos tal y como lo harían los sujetos normales aunque en menor proporción, permitiendo así que las células NK se encarguen de regular la aparición de clonas autoreactivas, así como de prevenir la aparición de neoplasias o de enfermedades infecciosas, ya que los pacientes lúpicos se encuentran inmunodeprimidos. Finalmente se abre la posibilidad de que en un futuro se pudiera utilizar las interleuquinas recombinantes para la inmunoterapia en el lupus eritematoso generalizado.

VoBo



Director de Tesis
Dr. Jorge Alcocer Varela

El presente trabajo se llevo a cabo en el laboratorio de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" bajo la dirección del Dr. Jorge Alcocer Varela.

Todo lo puedo en Dios que me fortalece"

Filipenses 4:13

A mi esposo en especial por tu apoyo e impulso para lograr una meta más en mi vida profesional.

A mis padres y hermanos por todo lo que me han dado.

AGRADECIMIENTOS

A mi jurado:

DR. JORGE ALCOCER VARELA

DRA. ANNIE PARDO SEMO

QUIM. REBECA FRANCO Y BOULARD

DRA. EDDA SCIUTTO CONDE

M. EN C. LUIS ANGEL DE JESUS TERAN ORTIZ

DR. RUBEN DARIO DE JESUS MARTINEZ PEREZ

DR. TR. CYDE. ARTURO ZENTENO GALINDO

por su

cuidadosa revisión del trabajo y sus sugerencias para mejorarlo.

A los Doctores Mario Cardiel y Antonio Villa por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

INDICE

Indice.....	i
Resumen.....	iii
Abreviaturas.....	vi
1. Generalidades de la respuesta inmune.....	1
2. Células asesinas naturales (NK)	
2.1 Características generales.....	1
2.2 Actividad NK.....	2
2.3 Morfología.....	3
2.4 Marcadores de superficie.....	4
2.5 Distribución y proporción.....	5
2.6 Función.....	6
2.7 Mecanismos de lisis.....	7
2.7.1 Fases del proceso citolítico.....	9
2.7.2 Moléculas citotóxicas.....	10
2.7.3 Perforina humana.....	11
2.7.4 Modo de acción de la perforina.....	12
3. Papel de las interleuquinas sobre la actividad NK	13
3.1 Efectos biológicos de la IL2, IL4, IL6, y el TNF... 15	
3.1.1 Interleuquina 2.....	15
3.1.2 Interleuquina 4.....	16
3.1.3 Interleuquina 6.....	17
3.1.3.1 IL6 y las enfermedades autoinmunes.....	18
3.1.4 Factor de necrosis tumoral.....	18
3.2 Regulación de la aNK por interleuquinas	
3.2.1 IL2 y su efecto sobre la aNK.....	20
3.2.2 IL6 sobre la actividad NK.....	23
3.2.3 Acción del TNF sobre la aNK.....	23
3.2.4 IL4 sobre la actividad NK.....	24

4. Alteraciones de la función NK en algunas enfermedades reumáticas.....	24
5. Generalidades del lupus eritematoso generalizado.....	24
5.1 Historia.....	25
5.2 Etiología.....	25
5.3 Influencia hormonal.....	26
5.4 Factores genéticos.....	27
5.5 Autoanticuerpos y autoantígenos.....	28
5.6 Respuesta inmune en los pacientes con LEG.....	29
6. Hipótesis	32
7. Objetivos	32
8. Material y Métodos	
8.1 Obtención de las células mononucleares.....	33
8.2 Células efectoras y células blanco.....	34
8.3 Ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹ Cr.....	35
8.4 Cuantificación fenotípica de las células NK.....	36
8.5 Pacientes.....	36
8.6 Análisis estadístico	37
9. Resultados	
9.1 Actividad NK en los pacientes con LEG.....	38
9.2 Efecto de la preincubación con IL2r.....	39
9.3 Efecto de la preincubación con IL4r, IL6r y TNFr... ..	40
9.4 Efecto de la preincubación con IL2 + IL6 y con IL2 + TNF.....	41
9.5 Efecto de la preincubación con IL4, IL4 + IL2, IL4 + IL6 e IL4 + TNF.....	44
9.6 Efecto de la combinación de IL6 + TNF sobre la aNK.	46
9.7 Análisis por grupo de la FCTN estimulada por ILs...	48

9.8 Fenotipo de las células efectoras.....	52
10. Discusión.....	54
11. Conclusiones.....	64
12. Referencias.....	66

Abreviaturas

NK	células asesinas naturales
LGL	linfocitos grandes granulares
ADCC	citotoxicidad mediada por anticuerpos
aNK	actividad citotóxica natural
CPK	complejo principal de histocompatibilidad
NKCF	factor soluble de citotoxicidad natural
PFK	perforina
LAK	células asesinas activadas por linfoquinas
aLAK	actividad citotóxica mediada por células LAK
PMA	acetato de forbol miristato
AR	artritis reumatoide
LEG	lupus eritematoso generalizado
NA	células no adherentes
CMN	células mononucleares
FCTN	actividad o función citotóxica natural
BBF	siero bovino fetal
ACT	pacientes con LEG activo
INAC	pacientes con LEG inactivo

RESUMEN

Con la finalidad de conocer la actividad citotóxica regulada por interleuquinas (IL) de las células no adherentes (NK CD56+) de los pacientes con lupus eritematoso generalizado, en el presente trabajo se estudiaron 24 pacientes que reunieron los criterios establecidos para esta enfermedad por el Colegio Americano de Reumatología, 15 de los cuales tenían datos clínicos de actividad y 9 estaban en remisión. Ningún paciente recibía tratamiento a base de antiinflamatorios no esteroideos, corticosteroides o inmunosupresores al momento del estudio.

Se obtuvieron células mononucleares (CMN) de sangre periférica de cada uno de los pacientes y del grupo control que estuvo formado por 14 mujeres normales. Las CMN se depletaron de monocitos por adherencia al plástico y se realizó tinción de inmunoperoxidasa de las células no adherentes (NA) para verificar que tuvieran menos del 1% de monocitos. Las células NA de los pacientes y del grupo control se incubaron por 18 hrs en presencia de suero autólogo y de suero bovino fetal descomplementados junto con las siguientes interleuquinas recombinantes: IL2 (0.5µg/ml); IL4 (100 U/ml); IL6 (5 U/ml); TNF (200 U/ml), IL2 (0.5µg/ml) + IL4 (100 U/ml); IL2 (0.5µg/ml) + IL6 (5U/ml); IL2 (0.5µg) + TNF (200 U/ml); IL4 (100 U/ml) + IL6 (5U/ml); IL4 (100U/ml) + TNF (200 U/ml); e IL6 (5 U/ml) + TNF (200 U/ml). Las dosis fueron establecidas por ensayos de proliferación en células dependientes.

Después de incubadas las células NA en presencia de las diferentes citocinas se realizaron ensayos de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr, frente a a la línea celular K562 sensible a células asesinas naturales (NK), calculando así el porcentaje de lisis específica para cada una de las condiciones. Además se determinó por citometría de flujo el número de células NK CD56+ de cada uno de los ensayos.

No se encontró diferencia en la actividad citotóxica entre los pacientes lúpicos con enfermedad inactiva y el grupo control, pero sí fué menor en los pacientes con lupus activo. En

presencia de suero autólogo ningún grupo mostró diferencia en su actividad NK (aNK) respecto a su basal. La IL2 incrementó la función citotóxica de los tres grupos. Mientras que la IL4, la IL6 disminuyeron la aNK de los controles y los pacientes con LEG inactivo, no así en los activos. El TNF provocó un descenso en la aNK respecto a su basal en siete de los nueve pacientes con LEG inactivo y no tuvo efecto sobre la aNK del grupo control y la de los pacientes con LEG activo. Cuando se realizaron las combinaciones de IL2+IL6 y de IL2+TNF se encontró aumento de la aNK tanto en el grupo control como en los pacientes; ésto cuando se comparó la condición basal contra la estimulada, no así cuando se comparó con la actividad lograda por estímulo con la IL2 sola. Mientras que la IL4 inhibió la aNK inducida por IL2.

La combinación de IL4+TNF no afectó la aNK mientras que la de IL4+IL6 en los controles y en los pacientes con LEG inactivo, dicha actividad disminuyó, aunque en cinco de ocho pacientes con LEG activo la aNK en las mismas condiciones aumentó respecto a la basal.

Solo en el grupo control y en el de los pacientes con LEG inactivo la IL6+TNF ejercieron un efecto inhibitorio sobre la nNK, ésto al compararse con la condición basal.

El análisis de la aNK entre los grupos mostró que la de los pacientes activos fué menor que la del grupo control y la de los pacientes inactivos, ya fuera en condiciones basales o estimuladas, lográndose restablecer a la normalidad en presencia de IL2 sola o en sus diferentes combinaciones.

Los pacientes con enfermedad inactiva se comportaron de manera similar al grupo control ya fuera cuando las células efectoras se cultivaron en presencia de las ILs solas o combinadas.

No hubo diferencia en el número de células no adherentes CD56+ (NK) entre los pacientes y controles.

Estos datos sugieren que existen mecanismos de regulación entre las diferentes interleuquinas y aunque los pacientes activos tienen una aNK menor, el comportamiento frente a ellas fué semejante, de tal manera que pueden responder a diferentes estímulos tal y como lo harían los sujetos normales aunque en menor proporción, permitiendo así que las células NK se encarguen de regular la aparición de clonas autoreactivas, así como de prevenir la aparición de neoplasias o de enfermedades infecciosas, ya que los pacientes lúpicos se encuentran inmunodeprimidos. Finalmente se abre la posibilidad de que en un futuro se pudiera utilizar las interleuquinas recombinantes para la inmunoterapia en el lupus eritematoso generalizado.

INTRODUCCION

1. GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNE.

El sistema inmune de un individuo está constituido por células especializadas, con funciones determinadas, que han sido caracterizadas de acuerdo a su papel en la respuesta inmune. Dichas funciones pueden ser influenciadas por una variedad de señales solubles resultando de tal interacción la activación, el aumento, la disminución o el arresto de la actividad celular.

Es fascinante observar que mientras diferentes células viven metabólicamente y estructuralmente en armonía, ciertas células especializadas son capaces de dañar y de eliminar a otras.

Eliminar un tipo celular por otro constituye uno de los mejores mecanismos de defensa del sistema inmune contra lo extraño y de ataque a lo propio (1).

En algunas formas de respuesta inmune celular, las células T específicas llevan a cabo la función efectora; en otras, las células T activadas por el antígeno secretan interleuquinas que activan y reclutan a las células efectoras que no son específicas, como los macrófagos y las células asesinas naturales (NK) protegiendo de esta manera al individuo de virus, bacterias y de células neoplásicas (2).

2. CELULAS ASESINAS NATURALES (NK).

2.1 CARACTERISTICAS GENERALES.

Las células asesinas naturales (NK) fueron descubiertas hace más de 20 años; desde entonces, su estudio ha abarcado diferentes áreas, estimulado por una serie de resultados que muestran su importancia en la resistencia del huésped a las neoplasias y a las

enfermedades infecciosas (3).

El origen de las células NK es controvertido. Sus precursores derivan de la médula ósea y no sufren maduración en el timo (4). Las células NK son semejantes a linfocitos grandes y tienen en su interior numerosos gránulos azurófilos, por lo que son llamadas linfocitos grandes granulares (LGLs) (5). Por su fenotipo, no son linfocitos T ni B; son en su mayoría células no adherentes y no fagocíticas (6).

Pueden ser definidas operacionalmente como células capaces de presentar actividad citotóxica espontánea en contra de una variedad de células blanco alogénicas y autólogas, y dicha actividad puede ser incrementada o disminuida por una variedad de factores solubles (7).

A diferencia de las células T, las células NK pueden lisar a sus células blanco sin antes haber recibido ninguna inmunización y sin necesidad de presentar antígenos del sistema principal de histocompatibilidad (CPH), aunque se ha visto que algunas clonas de células NK sí expresan moléculas de clase II (8,9).

Las células NK no sufren rearrreglos en sus genes de inmunoglobulinas, aunque la presencia del receptor (III) para la fracción Fc (FCR) les permite realizar citotoxicidad mediada por anticuerpo (ADCC) (10).

2.2 ACTIVIDAD NK

Las células NK se valoran por su actividad citotóxica natural, o actividad NK (aNK), que se caracteriza por no tener restricción al CPH, no ser específica al antígeno y carecer de memoria inmunológica (9,11).

La actividad citotóxica fue descubierta en individuos normales, al ser usados sus linfocitos como controles in vitro en ensayos de citotoxicidad con linfocitos de pacientes con cáncer, y los resultados mostraron que también estaba presente en las células de individuos infectados con virus y en sujetos sanos.

Para los ensayos "in vitro" se dispone de líneas celulares susceptibles de ser lisadas, por lo que se les utiliza como células blanco; es el caso de la línea K562, procedente del líquido pleural de un paciente con eritroleucemia. Las células se marcan con cromato de sodio radioactivo (Cr^{51}), valorándose la liberación del mismo como índice de actividad NK (12).

Las células asesinas naturales tienen además la capacidad de atacar a otra célula blanco una vez iniciada la lisis. A esta actividad se le conoce como reciclaje (13).

2.3 MORFOLOGIA

Las células NK, o LGLs, miden de 12 a 15 μ (9,7). Su núcleo se identifica por ser redondo, o con muescas y por contener un nucleolo extraordinariamente grande. Su citoplasma es abundante y contiene varios organelos, como mitocondrias y lisosomas. Tiene un aparato de Golgi bien desarrollado y con vesículas cubiertas, o lisas así como centriolos prominentes asociados a microtúbulos. También se observan en el citoplasma algunas vesículas pinocíticas y otras con una matriz densa a los electrones, rodeadas de algunas más pequeñas formando cuerpos vesiculares, figuras de mielina y estructuras tubulares.

Es común encontrar gránulos en el citoplasma. En las células en reposo éstos miden de 50 a 800 nm de diámetro y son circulares o alargados, con un centro denso a los electrones. Se tiñen para glicoproteínas, fosfatasa ácida, trimetanofosfatasa, arilsulfatasa, beta-glucoronidasa y esterasa, lo cual indica que son lisosomas primarios. La matriz de los gránulos está separada por una membrana trilaminar (9,7,14).

2.4 MARCADORES DE SUPERFICIE

Entre los anticuerpos que reaccionan con las células NK humanas están incluidos varios monoclonales como el B73.1, el 3G8, el CD16 y el CD2, aunque sólo la mitad reaccionan con este último. Por otro lado, entre 50-60% de las células NK humanas muestran reactividad con 3A1, 40-60% con NKH1 y cerca del 25% con determinantes del HLA-DR (3).

El fenotipo característico de las células NK humanas es CD3-, CD4-, CD38+, CD11b+, CD15-, CD56+ y CD16+ (15,16,17).

Las células NK presentan el receptor tipo III para la fracción Fc de las inmunoglobulinas (11) y la subunidad p75 del receptor para IL-2, no así la p55, por lo que pueden ser inducidas a proliferar con altas concentraciones de IL-2 (18). Una subpoblación de células NK se distingue por la expresión tanto de la cadena p75 como de la p55 (19).

Los marcadores de superficie y las propiedades de adhesión de las células NK varían dependiendo de su estado de activación o maduración, aunque los marcadores no cambian después de la

estimulación con interferón o con IL-2 (3).

2.5 DISTRIBUCION Y PROPORCION

En el humano, las células NK comprenden aproximadamente el 5-8% del total de los leucocitos de sangre periférica, y el 1-15% de las células mononucleares, pero la proporción puede variar dependiendo del anticuerpo utilizado (16).

Las células NK también se encuentran en los ganglios linfáticos, en el bazo, en el timo, en la médula ósea (14), en los pulmones y en el hígado.

Estudios realizados en rata han demostrado un alto grado de asociación de los LGL con los epitelios mucosos, especialmente con el tejido linfoide del epitelio bronquial y del epitelio intestinal. Se han aislado LGL también en el hígado de ratones y se ha visto que aumenta más de veinte veces la cantidad de LGL en este órgano después del tratamiento con inmunorreguladores.

Las células NK muestran diferentes niveles de actividad dependiendo del órgano en que se encuentren. Estudios iniciales hechos en el ratón, en ratas y más recientemente en humanos, han demostrado altos niveles de aNK en sangre periférica y en el bazo, así como un nivel que va de intermedio a bajo en ganglios linfáticos, en la cavidad peritoneal y en la médula ósea.

Los LGL de la mucosa del intestino delgado de ratones poseen desde un nivel intermedio hasta uno alto (3). No se ha detectado actividad en las amígdalas ni en el timo.

Pacientes con cáncer, que han recibido terapia con altas dosis de interferón, muestran poco o ningún aumento de la actividad NK, y algunas veces, una considerable disminución antes del tratamiento

(6).

La aNK se encuentra disminuida en pacientes con varios tipos de neoplasias, como leucemias y carcinomas; aunque no se conoce el mecanismo por el cual disminuye, parece estar vinculado al crecimiento progresivo del tumor (3,14).

2.6 FUNCION

Ya que los receptores de células T (TCRs) reconocen péptidos unidos a los antígenos del CPH, lo cual no hacen las células NK, al parecer éstas proveen al individuo de un mecanismo más directo para la eliminación de células transformadas o infectadas con virus, que han perdido los antígenos del CPH y evadido el reconocimiento por parte de las células T (20).

Se ha encontrado que las células NK son capaces de presentar antígenos a las células T (21).

Experimentos in vivo han mostrado una correlación entre la incidencia de tumores e infecciones y la disminución de la actividad NK, así como también entre el rechazo de injertos y el aumento de la aNK (14).

No solamente las células malignas son vulnerables a las células NK sino también las fetales, las de la médula ósea, los timocitos, los macrófagos, los fibroblastos (6) y las células infectadas por virus (citomegalovirus, de la hepatitis, de la influenza y de la inmunodeficiencia humana)(16). Además eliminan parásitos intracelulares y extracelulares como hongos y bacterias (22).

La células NK están involucradas en el rechazo de tejidos, incluyendo el de médula ósea, y en varias enfermedades

intestinales. Contribuyen al desarrollo de algunas formas de diabetes, de anemia aplásica y neutropenia (8).

2.7 MECANISMOS DE LISIS

Pese a los intensos estudios que se han realizado hasta la fecha, no se sabe qué molécula(s) en la superficie de las células blanco son las que están involucradas en el reconocimiento por parte de las células NK. El receptor de transferrina y el receptor para la fracción Fc de la IgG han sido las estructuras implicadas en este reconocimiento, aunque tales resultados son controversiales.

El receptor de laminina también ha sido asociado al reconocimiento de las células blanco por parte de las células NK. Resultados adicionales han mostrado que las células NK pueden presentar más de un receptor para antígeno sobre su superficie y que por lo tanto son capaces de reconocer múltiples antígenos sobre la superficie de más de una célula blanco (23).

Ciertas moléculas de adhesión, como el LFA-1, la ICAM-1, el LFA-3 y el CD18, parecen también estar involucradas en la conjugación de la célula efectora con la blanco, ya sea solas o en asociación con otros receptores de membrana, generando señales bioquímicas que activan los mecanismos líticos de las células NK (24).

La citotoxicidad llevada a cabo por células NK se inicia con el reconocimiento de los antígenos de la célula blanco por parte de los receptores de la célula efectora. La unión de ambas células ocurre rápidamente, tanto a 4°C como a 37°C, y requiere de Mg^{2+} , no así de Ca^{2+} .

Después de la unión, la célula NK sufre una serie de eventos conocidos como activación y programación, para la lisis de la célula blanco. Estos eventos son dependientes de la temperatura, la óptima es de 37° C , y de Ca²⁺, y son sensibles a los inhibidores de calmodulina.

Algunas evidencias sugieren que la señal transmembrana de segundos mensajeros, derivada de hidrólisis de los lípidos del fosfoinositol, provee las señales requeridas para activar el mecanismo lítico después de la unión.

El inicio de la activación de la célula NK depende de un aumento en el metabolismo del fosfoinositol; este metabolismo es independiente del Ca²⁺ extracelular y es disparado por interacción del CD16, con la célula blanco cubierta de anticuerpo, u otra estructura de membrana desconocida.

La formación de IP3 y de IP4 induce un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular, primero por la liberación de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares y después por una entrada de Ca²⁺ extracelular, el mismo que es requerido para mantener los niveles incrementados (15,25).

También se ha visto que un incremento en el CAMP inhibe la citotoxicidad mediada por células NK.

Estudios detallados han demostrado que el mecanismo de lisis requiere que las células blanco sean reconocidas por las células NK, que se conjuguen y que las NK sean capaces de inducir a las efectoras para que liberen NKCF u otros mediadores líticos (6,7,26).

2.7.1 FASES DEL PROCESO CITOLITICO

La secuencia postulada por Herberman et al (6) para la citólisis es la siguiente:

- 1) Unión de la célula NK a la célula blanco.
- 2) Activación de las células NK.
- 3) Ruptura de los gránulos y liberación de las citolisinas.
- 4) Unión de las citolisinas a la célula blanco.
- 5) Lisis por formación de poros en la membrana celular.

Algunos otros autores proponen que la lisis se efectúa por unión de los factores NK a las células blanco, endocitosis, fragmentación del DNA y muerte celular (27).

Otro mecanismo postulado para la lisis es a través del TNF, aunque es diferente a los previos, ya que el TNF actúa a través de su receptor (28).

Roder y colaboradores (29) han dividido el proceso de lisis en varias etapas. El reconocimiento primario y la formación del conjugado entre la célula NK y las células blanco, que probablemente incluye un receptor del tipo lectina que se une específicamente a un carbohidrato sobre las células blanco, es independiente de Ca^{2+} y de temperatura, pero dependiente de Mg^{2+} .

Como ocurre en la citotoxicidad llevada a cabo por las células T, en la lisis por parte de las células NK el aparato de Golgi se orienta hacia la parte de unión con la célula blanco y se forman poros en la membrana de la célula que está siendo atacada.

Debido a que sólo ciertas células son atacadas por las NK, se cree que debe existir un sitio aceptor para el factor soluble de

citotoxicidad NK (NKCF) (29).

2.7.2 MOLECULAS CITOTOXICAS

Las moléculas citotóxicas liberadas por las células NK, como el NKCF (factor soluble de citotoxicidad NK), las citolisinas o perforinas (30,31,32) y algunas proteasas de serina, han sido encontradas en los gránulos citoplasmáticos de las células NK.

La perforina, cuyos sinónimos son citolisina, proteína formadora de poros y proteína relacionada con la fracción del complemento C9, recibe su nombre debido a su habilidad para formar poros en las membranas, constituyendo grandes canales transmembranales.

La función principal de la perforina es lisar la membrana de las células blanco, ocasionándoles la muerte. Tiene un peso molecular de 66 o 70 kDa, y en presencia de calcio forma agregados de varios tamaños, incluyendo formas con un peso molecular que excede el millón de daltones. La microscopía electrónica muestra que estos agregados semejan túbulos con un diámetro promedio de cerca de 16 nm.

Solamente una especie de perforina activa ha sido aislada.

Un reporte preliminar describe la clonación del cDNA de la perforina de linfocitos murinos, con una homología significativa con la proteína C9 del humano.

En general las células nucleadas requieren de concentraciones más altas de PFP para la lisis, que los eritrocitos anucleados (34).

2.7.3 PERFORINA HUMANA

La perforina humana es codificada por una copia simple de genes localizados en el cromosoma 10 (35) y en el 17 (36). Ambos genes están constituidos de solamente 3 exones. El exón 1 codifica para la mayor parte de la secuencia 5' y el exón 2 para el resto de la secuencia 5', para la señal de inicio de la traducción, el péptido señal y para la parte N terminal de la molécula. El exón 3 codifica para el resto de la secuencia, incluyendo la secuencia 3' (37).

La perforina humana consta de una secuencia de 534 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 60,000 (38).

El mRNA de la perforina no es regulado como los mensajeros de las linfocinas.

Los linfocitos humanos de sangre periférica expresan niveles moderados de mRNA de perforina, que se incrementan rápidamente por estimulación con IL-2, la cual además promueve la proliferación de los linfocitos T y de las células NK. Debido a que la IL-2 es usada para generar células activadas por linfoquinas (LAK), es posible que el incremento en la expresión de la perforina esté directamente ligado al aumento de citotoxicidad en estas células.

La inducción del mRNA de la perforina es transitoria y es bloqueada parcialmente por la ciclosporina A, una droga comúnmente utilizada para inhibir el rechazo de un injerto.

La expresión de la perforina en células sin estímulo está restringida a las células NK CD3- y a dos poblaciones de células T, concretamente las que expresan el receptor gamma-delta con una actividad litica semejante a la de las células NK (30).

2.7.4 Modo de acción de la perforina.

De acuerdo a un modelo recientemente propuesto, las células NK se desgranulan después de la unión con su célula blanco, liberando los monómeros de perforina / PFP en el espacio intercelular.

Cuando la perforina sale al espacio extracelular, el calcio presente induce la unión de perforina dimérica o monomérica para formar complejos que se insertan y atraviesan la membrana, formando poros.

Los oligómeros formados muestran el lado hidrofóbico de la molécula hacia la parte lipídica, mientras que la parte hidrofílica descansa sobre el interior del poro.

Estudios de dosis dependencia indican que al menos se necesitan 3-4 monómeros para formar un poro funcional. Los monómeros de PFP pueden agregarse progresivamente (10-20 monómeros), formando un túbulo visible que crea un canal transmembranal (14nm). La formación de túbulos macroscópicos no es un prerrequisito para la formación del poro, pero es interpretado como un estado terminal del ensamble del mismo, que ocurre cuando se han alcanzado las cantidades adecuadas de PFP.

Una vez formados los poros de perforina permiten la salida de grandes proteínas y llevan a una eventual lisis de la célula blanco por efecto osmótico, así como por la disminución de energía y del influjo de calcio.

La perforina polimérica, como la proteína C9 del complemento, es incapaz de insertarse a las membranas. El pH bajo, y una alta concentración de Ca y de Zn, bloquean a la perforina (39).

Los requerimientos para la exocitosis de gránulos en las células NK no se conocen. Es posible que la expresión lítica de la

perforina sea principalmente una propiedad de las células NK. En los CTL solamente se adquiere esa propiedad cuando se convierten en células semejantes en especificidad funcional a las células NK, como resultado de la estimulación con algún factor de crecimiento.

La expresión in vivo de la perforina correlaciona con la infiltración de células T citotóxicas y con la citotoxicidad local en tumores, en las infecciones virales, en las reacciones autoinmunes y en los trasplantes.

Recientemente Mac Dermott, Schmidt y colaboradores han encontrado que los gránulos de las células NK clonadas también contienen condroitin sulfato tipo A, que forma un complejo con las moléculas citolíticas y facilita su transferencia a la célula blanco. Por otro lado, altas concentraciones de condrotin sulfato A dentro de los gránulos hacen que se una a la perforina y la inactive. (21,40)

¿Qué hace que los linfocitos T citotóxicos resistan a la perforina? Se han propuesto algunas teorías, como la reparación de la membrana y la existencia de factores protectores, tales como proteínas específicas de superficie. Así, se sabe que las células que tienen menos ácido siálico en la membrana también tienen menos afinidad de unión a las NK y por lo tanto son más resistentes a la lisis.

3. PAPEL DE LAS CITOCINAS SOBRE LA ACTIVIDAD NK.

La actividad NK puede incrementarse o disminuirse por una variedad de factores solubles, como las citocinas.

Las citocinas abarcan un amplio espectro de moléculas solubles (41,42) celulares conocidas como linfoquinas, monoquinas e

interleuquinas.

Originalmente se utilizó el término linfoquinas porque se creía que eran moléculas producidas sólo por linfocitos y que servían para comunicarse con otras células del sistema inmune. Más tarde se vio que su efecto no estaba restringido a células del sistema inmune, por lo que se prefirió el término citocina (43), por ser más genérico. En 1969 se prefirió sobre este último el de interleuquina, debido a que reflejaba mejor las propiedades básicas de estos mediadores, que sirven como ligadores entre leucocitos (44), controlando de esta manera la amplitud y la duración de la respuesta inmune.

Las interleuquinas son mediadores químicos solubles, biológicamente activos, constituidos por proteínas pequeñas (menos de 80 KD), generalmente glicosiladas (44,45) (TABLA 1). Actúan a corta distancia, ya sea de manera parácrina o autócrina, aunque pueden tener efectos sistémicos.

TABLA 1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE ALGUNAS INTERLEUQUINAS

	IL-2	IL4	IL6	TNF
PM Kd	15-20 (46)	15-19 (47,44)	21-28 (48)	17 (49,50)
Localización cromosómica	4q	5q	7q	6p
Receptor PM	50,64,75	120	80/130 (51)	75,55 (53)

Las interleuquinas son liberadas en respuesta al antígeno,

está determinada por él. Son secretadas por una amplia variedad de células, además de ejercer sus efectos sobre diversas células blanco (TABLA 2).

TABLA 2. FUENTE CELULAR Y CELULAS BLANCO DE ALGUNAS INTERLEUQUINAS

INTERLEUQUINA	FUENTE	CELULA BLANCO
IL-2	Células T (47,44)	Células T, B, macrófagos, células NK, LAK, timocitos y oligodendrocitos(43,44) .
IL-4	Células T (44,54)	Células T, B, NK,mastocitos(54), macrófagos y progenitores hematopoyéticos (45,44).
IL-6	Células de mixoma, mieloma, hipernefoma. (42,48,55) fibroblastos (47), macrófagos, células T endoteliales, de la glía, queratinocitos, condrocitos astrocitos (50), y células de la tiroides.	Células B, timocitos, plasmacitoma, hepatocitos neuronas, células menangiales del riñón y queratinocitos (44,48,55).
TNF α	macrófagos, células T, B, NK y timocitos (49,56,57).	Células tumorales, macrófagos, osteoclastos, neutrófilos, adipocitos, eosinófilos, células endoteliales, condrocitos y hepatocitos (49,52,56).

3.1 Efectos biológicos de la IL2,IL-4,IL-6 y el TNF.

3.1.1 Interleuquina 2 (IL-2).

La actividad de IL-2 sobre los linfocitos se lleva a cabo por

el reconocimiento a través de receptores específicos que se expresan en la subpoblación de células T diferente a la que dio origen a la interleuquina, o en las células relacionadas, lo que permite a los linfocitos proliferar, expandirse y llevar a cabo funciones de ayuda, supresión o citotoxicidad. (43,58)

3.1.2 Interleuquina 4 (IL-4).

Actúa sobre células B en reposo aumentando su volumen celular y mejorando su viabilidad; incrementa la expresión de moléculas de clase II del CPH (44), y cuando las células B se pretratan con esta linfoquinaina se acelera la respuesta anti-IgM, lo que indica que la IL-4 no es un factor de crecimiento sino de activación o competencia.

La IL-4 promueve el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas del ratón de IgM, IgG3 e IgG2b a IgG1, IgG2A e IgE, (44) lo que sugiere que está relacionada con los fenómenos de hipersensibilidad inmediata.

La IL-4 estimula el crecimiento tanto en los timocitos fetales como en los doble negativos de sujetos adultos, en cooperación con el PMA, y promueve el crecimiento de las células cebadas (54) también induce la expresión de antígenos clase II sobre macrófagos, además de que incrementa su habilidad de célula presentadora de antígeno ante las células B e induce su actividad tumoricida.

La IL-4 también estimula la fusión de células de la médula ósea y de macrófagos alveolares para formar células gigantes multinucleadas, lo que sugiere que tiene un papel importante en la formación de granulomas (47).

3.1.3 Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 induce la producción de IgM, IgG e IgA en células mononucleares de sangre periférica, después de la estimulación con PWM, pero no tiene ningún efecto sobre la proliferación de células B. Lipsky et al. comprobaron que la IL-6 no induce directamente la producción de Ig por parte de las células B.

La IL-6 tiene un efecto coestimulador para la proliferación de células T activadas con mitógenos e incrementa la respuesta de las células hematopoyéticas pluripotenciales para la producción de IL-3

La IL-6 puede inducir la generación de los linfocitos T citotóxicos que son específicos para células tumorales o infectadas con virus (44).

El papel que lleva a cabo la IL-6 en la activación de las células T es promover el paso de la fase G0 a una fase temprana de G1 en donde ya son sensibles a la IL-2 (51).

La IL-6 funciona como factor estimulador de células T en diferentes estadios de su diferenciación. Por ejemplo, estimula la proliferación de timocitos CD4+ y de CD8+ que han sido coestimulados con IL-2 e IL-4.

La IL-6 activa la producción de IL-2, aunque no estimula en forma directa la proliferación celular (47).

La IL-6 tienen un papel relevante en mecanismos de defensa del hospedero, pues participa en los procesos inflamatorios, infecciosos y en el daño tisular.

La IL-6 juega un papel importante en la respuesta de fase aguda. Induce un aumento en el nivel de mRNA de fibrinógeno beta,

actúa como inhibidor del mRNA de la proteinasa de cisteína y de la alfa-2 macroglobulina, además induce fiebre (51).

3.1.3.1. La IL-6 y las enfermedades autoinmunes.

La hipergamaglobulinemia policlonal es una de las manifestaciones más comunes en las enfermedades autoinmunes.

En el 92% de los líquidos sinoviales de los pacientes con artritis reumatoide (AR) se detectan niveles elevados de IL-6 (41). Además de que los pacientes con AR característicamente presentan plasmocitosis policlonal, autoanticuerpos, un incremento en las proteínas de fase aguda y de las plaquetas (55).

En los pacientes con LEG activo, el nivel de IL6 en el suero y líquido cefalorraquídeo está elevado principalmente en aquellos que presentan linfadenopatía y síndrome nefrótico (59,60).

La infección con HIV induce la producción de IL-6 por monocitos y el nivel de esta citocina está incrementado en el suero de pacientes con SIDA (33).

3.1.4 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

Activa a las células T y B. Induce la expresión de los oncogenes c-fos y c-myc en células tumorales, así como la expresión de antígenos Clase I, Clase II del CPH y de ICAM 1 sobre astrocitos y queratinocitos.

Promueve la síntesis de IL-1, del GM-CSG, de IL-6, de los receptores de EGF y de IL-2. Incrementa la síntesis de PGE2 y de colagenasa. Activa los neutrófilos. En las células endoteliales induce la actividad procoagulante y regula la expresión de antígenos de superficie (61).

El TNF suprime la formación de colonias hematopoyéticas. y tiene acción mitógena sobre los fibroblastos.

Parece ser el responsable de las actividades asociadas con el factor citotóxico derivado de NK y con efecto inhibitor de colonias de células NK (57).

En el hueso se comporta como un potente estímulo para la reabsorción ósea, con una potencia similar a la PTH y no actúa directamente sobre los osteoclastos (42).

Disminuye el depósito de colágena al estimular la producción de colagenasa (41) así como el contenido de fosfatasa alcalina y de un marcador que indica la formación de nuevo hueso por las células osteoclasticas. En cuanto a la reabsorción de cartilago, degrada los proteoglicanos además de inhibir su síntesis.

Tiene acción antiviral, citostática y citotóxica sobre las células tumorales, y favorece la citotoxicidad tumoral inducida por células NK (57). Posee acción pirógena; inhibe la lipasa de lipoproteínas induciendo caquexia e induce la síntesis de proteínas de la fase aguda.

Induce la secreción de IL-1 por monocitos y células endoteliales(42), así como la expresión de varios antígenos sobre la superficie de estas últimas. Estimula la producción de factores de crecimiento hematopoyéticos, del factor de crecimiento derivado de plaquetas, del factor activador plaquetario y de la prostaglandina I2 (61).

Es un potente activador del metabolismo oxidativo de los neutrófilos lo que resulta en el aumento en la producción de superóxido.

En animales de experimentación provoca choque, fiebre,

coagulación intravascular diseminada y degranulación linfocitaria.

El TNF también es capaz de producir a nivel sistémico toxicidad ,induciendo hipotermia, hipotensión, hiperglucemia, seguida de hipoglucemia y acidosis (56).

En pacientes con AR se ha encontrado un nivel elevado de TNF alfa tanto en el suero como en el líquido sinovial, correlacionándose ambos niveles con el grado de actividad de la enfermedad.

Los pacientes con LEG asociado a trombocitopenia tienen nivel sérico elevado de TNF alfa (59).

3.2. REGULACION DE LA aNK POR CITOCINAS

La caracterización de la función de las interleuquinas como segundos mensajeros para la activación de células NK es un paso importante que hay que abordar para el entendimiento de su diferenciación y de sus mecanismos de lisis.

La actividad citotóxica natural mediada por linfoquinas fue descrita inicialmente por Grim y colaboradores (62) quienes le dieron el nombre de actividad LAK (lymphokine activated killer activity). Desde entonces se han realizado numerosos trabajos para conocer el tipo de células que son las responsables de la función LAK.

3.2.1 IL2 y su efecto sobre la actividad NK

Se piensa que las células NK activadas por linfoquinas (LAK) son linfocitos derivados de las NK y activados por linfoquinas(63), ya que en cultivo in vitro la activación de linfocitos humanos de sangre periférica con IL-2 resulta en la generación de células

citotóxicas que lisan células tumorales resistentes a NK, sin restricción del CPH, y tanto las células efectoras como las progenitoras muestran fenotipo de células NK, o sea son células CD3-, Leu19+. Aparentemente la IL-2 recombinante les provee de la señal para que las NK lisen las células tumorales, (64) aumentando su aNK (65,66,67).

También se ha sugerido que las células LAK son diferentes de las NK y se menciona que son indistinguibles de los CTL pues expresan los marcadores CD3, CD8, y CD5. Los linfocitos T CD56+ aparentemente proliferan más rápidamente en respuesta a IL-2 recombinante que las células NK.

De aquí se desprende la idea que en sangre periférica las efectoras de la función LAK son células NK, mientras que en los tejidos son probablemente linfocitos T CD3+(68).

Grim y cols.(69,70), sostienen la idea de que los precursores de LAK no son necesariamente células NK pero dejan abierta la posibilidad de que las NK también puedan ser precursores de LAK.

Se sugiere que los linfocitos CD3+,CD56+, las subpoblaciones CD4+,CD8+, así como que algunas células B, pueden tener actividad LAK pero por las limitaciones técnicas para la separación de los linfocitos no es posible confirmar esta posibilidad (71).

En el bazo de la rata los linfocitos agranulares (LAL) cultivados en presencia de IL-2 se diferencian a LGL adquiriendo características de células NK, de aquí que se piense que las células LAK, los LAL y los LGL/NK representen diferentes estados del desarrollo o de la activación y que los LAL comprenda una fuente de progenitores LAK en las poblaciones linfoides con pocos LGL o de células NK activas y maduras. No obstante en humanos no se

ha logrado el desarrollo de LGL a partir de LAL (72).

Se ha visto que la IL-2 además de incrementar la función citotóxica en células NK, tiene efecto sobre la actividad citotóxica espontánea, ya que la actividad NK se reduce después de exponer a las células a los anticuerpos anti IL-2. Por otro lado si se agrega IL-2 al sistema después de un corto tiempo de haberse incubado con IL2, la actividad NK es parcialmente restablecida, pero si se agrega la misma cantidad de interleuquina después de haber preincubado por 20 horas el anticuerpo con las células blanco ya no es posible recuperar la función citotóxica, lo que demuestra la importancia de la IL-2 en la actividad citotóxica de las células NK humanas (73).

En cuanto a las características fenotípicas de las células NK respondedoras a la IL-2 se ha encontrado que todas ellas expresan en su superficie el marcador CD16. Las células que carecen de ese antígeno no expresan actividad citotóxica después de haber sido expuestas a este factor.

En contraste, la rIL2 aumenta la actividad NK tanto en células CD57-, CD16+ como en las CD57+, CD16+ (74) Otro rasgo interesante que muestran las células NK respondedoras a la IL-2 es que las que son CD16- expresan constitutivamente receptores para IL-2 in vivo y responden preferencialmente a bajas dosis de IL-2 (75). Además de incrementar la actividad NK, la IL-2 (76), promueve la producción de IFN gamma (77).

Otro efecto que tiene la IL-2 sobre las células NK es que regula la producción de IgG2a cuando los esplenocitos murinos son cocultivados con células B preestimuladas con LPS y lo hacen vía interferón gamma (78).

3.2.2 Acción de la IL-6 sobre la actividad NK

En cuanto a la IL-6 se ha observado que incrementa la actividad citotóxica (79) de las células NK humanas aunque los resultados son controversiales.

El efecto de la IL-6 sobre la actividad de las células NK puede ser bloqueado por un anticuerpo monoclonal dirigido contra la IL-2. La IL-6 es una potente inductora de la producción de IL-2 en células humanas de sangre periférica, por lo que el incremento de la actividad citotóxica de las NK puede ser por IL-2 (80).

En lo que se refiere a la interacción entre linfoquinas sobre la actividad NK, se reporta que la IL-6 sola o en combinación con IL-2, aumenta considerablemente la actividad NK de LGL en contra de células K562, pero no tiene ningún efecto la IL-6 sola, o en combinación con la IL-2, sobre la expresión de mRNA de PFP en incubaciones cortas o largas (81).

3.2.3 Acción del TNF sobre la aNK.

Otra citocina que se ha visto que aumenta la actividad citotóxica de los LGL CD16+ es el rTNF alfa y el efecto es todavía mayor si, se coestimulan con rIL-2, observándose un incremento en la expresión de receptores sobre las células CD16+; esto indica que el rTNF-alfa incrementa la capacidad lítica de las células NK, y aumenta su capacidad para ser activadas funcionalmente por rIL-2 (82).

En contraposición a esta observación se ha encontrado que el TNF no aumenta la citotoxicidad después de haber incubado las células NK por 18 horas (83).

El rTNF alfa puede proteger a células adherentes (del tipo

células amnióticas y células Hela 229 del carcinoma epitelial cervical) de la citotoxicidad mediada por células NK de una manera dosis dependiente. El efecto protector del TNF alfa no es mediado por la inducción de IL-6 (84).

3.2.4 Efecto de la IL-4 sobre la actividad NK .

La rIL-4 no actúa sobre la actividad NK de células en reposo, no obstante si es capaz de inhibir de manera dosis dependiente la actividad citotóxica inducida por rIL-2 así como la proliferación de las células NK (85).

En células de la médula ósea y en células de sangre periférica no se encuentra actividad LAK cuando se incuban con IL-4; pero la preincubación con la IL-2 y la IL-4 suprime la aNK así como, la LAK inducida por la rIL-2 (86,87).

4. ALTERACIONES DE LA FUNCION NK EN ENFERMEDADES REUMATICAS

En las enfermedades generalizadas del tejido conectivo como el síndrome de Sjogren, la poliomiositis, la dermatomiositis y en el lupus eritematoso generalizado se han establecido anomalías en la función NK, sin embargo en los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo y con escleroderma está se encuentra normal (88,89,90,91).

5. GENERALIDADES DEL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es considerado como una enfermedad autoinmune humana que se caracteriza por una amplia variedad de manifestaciones clínicas e inmunológicas (92) .

A pesar de los numerosos esfuerzos realizados para dilucidar

la etiología de la enfermedad, su origen, es aún desconocido.

En su patogenia participan factores inmunológicos, genéticos, hormonales y ambientales (93).

5.1 HISTORIA

La primera descripción de esta enfermedad se hizo hace cerca de 150 años en Viena por Ferdinand von Hevbra. Su discípulo y sucesor Moriz Kaposi, fue el primero en reconocer la naturaleza sistémica del LEG (Kaposi 1899). En las siguientes décadas los rasgos clínicos y patológicos del LEG fueron mejor definidos. Después de la segunda guerra mundial, surgieron tres hechos importantes: 1) Klemperer (1950) reconoció que es una entidad diferente de la artritis reumatoide, la dermatomiositis y de la escleroderma, pero comparte algunas características con ellas. 2) Hargravres y cols. describieron en el año 1952 el fenómeno de la célula LE que desde entonces ha sido una herramienta utilizada para el diagnóstico del LEG; 3) el rasgo patogénico más importante de todos, la base autoinmune para el fenómeno de las células LE, fue descrito por Miescher y Fauconnet (1953-1954), cuando estos autores encontraron que el fenómeno de las células LE es mediado por un factor presente en el suero de los pacientes con LEG. Este factor lo absorbieron de los núcleos, y demostraron que correspondía a una inmunoglobulina que más tarde fue conocido como anticuerpo antinuclear (ANA) (Miescher, 1957) (94).

5.2 ETIOLOGIA

Se requiere de factores externos para la expresión del LEG como la luz ultravioleta, la influencia hormonal y los virus.

En 1981, Emerit et al. mostraron que la "inestabilidad cromosómica" es inducida en los pacientes lúpicos por una sustancia soluble liberada de los linfocitos después de la irradiación con luz ultravioleta (UV) y se ha sugerido que ésta puede ser la responsable de la sensibilidad de los pacientes a la luz UV.

Se ha propuesto desde hace tiempo que las infecciones virales desencadenan el LEG pero no ha sido posible demostrarlo plenamente (95). En el lupus murino se ha encontrado una glicoproteína retroviral gp70, con el anticuerpo correspondiente formando inmunocomplejos patogénicos (Mellors et al. 1968).

Existe una variedad de LEG que es secundaria al uso de medicamentos. La procainamida es uno de los que con mayor frecuencia puede inducir la producción de anticuerpos antinucleares en el 50% de los pacientes tratados con dicha droga (96).

5.3 INFLUENCIA HORMONAL

Hay un mayor número de casos de LEG en las mujeres que en los hombres y se ha encontrado una alta incidencia de LEG en pacientes con síndrome de Klinefelter, y en los hombres con un cromosoma X extra lo que explica una mayor influencia estrogénica (97).

La castración de ratones machos NZB/W resulta en un patrón de enfermedad similar a la que ocurre en las hembras, mientras que la administración de andrógenos en ratonas resulta en un aumento en la longevidad con poca o ninguna evidencia de fenómenos autoinmunes (98,99). Esto también es válido para ratones MRL, que es otra cepa de ratones susceptible de desarrollar LEG.

La presencia de los receptores para hormonas sexuales en el timo sugiere que existe una función inmunorreguladora de estas

hormonas que puede influir la producción de hormonas tiroideas; además, se ha visto que los estrógenos afectan la función fagocítica de los macrófagos (100).

5.4 FACTORES GENÉTICOS

A pesar de las extensas investigaciones sobre las asociaciones de los fenotipos del HLA en el lupus, es todavía incierto si estas representan un enlace de los genes de la enfermedad con el complejo principal de histocompatibilidad o si la asociación real es con el polimorfismo funcional de los productos de los genes del HLA.

Existe una modificación de la expresión de la enfermedad por productos de otros genes localizados en el CPH; por ejemplo, los individuos HLA-DR2 y DQW1 tienen menor producción de TNF alfa y el mismo fenotipo del CPH se asocia con nefritis lúpica (101).

Estudios poblacionales han mostrado que el LEG se asocia con los marcadores HLA clase II DR2 y DR3 y un aloantígeno de células B (Lawlwy et al. 1982).

Otra asociación genética fuerte parece ser con alelos nulos de C4. Las relaciones con DR3 y B8, de hecho, se han atribuido a la presencia de genes "nulos" de C4A, una delección genética peculiar de este haplotipo en individuos caucásicos. Aunque los estudios de familias muestran que las asociaciones con el HLA y con los alelos del complemento no explican todos los casos de LEG ni aún dentro de la misma familia (102).

Estudios genéticos de otros sistemas de respuesta inmune han sugerido el papel del receptor de las células T como factor de susceptibilidad a lupus así como para la producción de autoanticuerpos (anti-Ro). Se sabe que los anti-Ro y anti-La

presentes en los pacientes con LEG y en aquellos con síndrome de Sjogren están asociados con especificidades del HLA-DQ. Algunos investigadores han identificado alotipos de inmunoglobulinas asociados con el lupus (Gm y Km) (102).

Los componentes del complemento C4, el C2 y el factor B son genéticamente controlados por la región del HLA. La deficiencia de C3 y C2 es frecuente pero no siempre esta asociada al desarrollo de LEG (94).

De las asociaciones de antígenos del HLA con variables clínicas del LEG, se sabe que la epidermólisis ampollar se asocia al DR2 (103), la presencia de anti-Ro y de anti-La y las manifestaciones clínicas relacionadas con DR2 o DR3, mientras que los títulos altos de dichos autoanticuerpos se asocian al estado heterocigoto DQw1/DQw2 (104).

5.5 AUTOANTICUERPOS Y AUTOANTIGENOS

Los pacientes con lupus eritematoso desarrollan autoanticuerpos en contra de un amplia variedad de antígenos. Estos comprenden anticuerpos en contra de neuronas, linfocitos, y contra varios constituyentes citoplasmáticos procedentes de organelos o de membrana; sean o no tejido o célula específico, como por ejemplo, contra antígenos extracelulares tales como gamaglobulina, cardiolipina o tiroglobulina y contra constituyentes nucleares (105).

Los anticuerpos en contra del DNA nativo de doble cadena (dsDNA) son altamente específicos para el lupus eritematoso generalizado y sus títulos son buenos indicadores de la actividad de la enfermedad. Los anticuerpos en contra del DNA desnaturizado

(ssDNA) se encuentran generalmente a títulos altos y se ha visto que forman parte de los complejos inmunes detectados en algunos pacientes. Un prerrequisito para que sean considerados patógenos, es que estos anticuerpos tengan que ser eficientemente activados por el sistema del complemento.

Se han encontrado también anticuerpos contra ribonucleoproteínas (RNP) y contra proteínas nucleares no histonas, llamadas Sm. Estos anticuerpos son marcadores específicos en el LEG y su presencia puede asociarse con el curso clínico de la enfermedad ya que se ha visto que los pacientes con anticuerpos en contra de las RNPs desarrollan nefritis, solamente cuando otro sistema antígeno-anticuerpo, como por ejemplo el de anti-DNA, está también presente.

Otros autoanticuerpos encontrados en los pacientes lúpicos están dirigidos contra los antígenos llamados Ro y La o SSA y SSB (Síndrome de Sjögren A y B). Estos anticuerpos, que tienen especificidad contra antígenos celulares, pueden ser encontrados en los pacientes lúpicos con anticuerpos antinucleares (ANA) negativos. Se ha detectado que los pacientes con los dos tipos de anticuerpos presentan una enfermedad más benigna que los que solamente tienen el anticuerpo Ro (106).

5.6 RESPUESTA INMUNE EN LOS PACIENTES CON LEG

Numerosos trabajos revelan alteraciones en el circuito de inmunorregulación en los pacientes con LEG, no sólo en la interacción celular, sino en la activación y respuesta a interleuquinas, lo cual de alguna manera, tiende a favorecer o incrementar la proliferación o diferenciación de las células B con

el consecuente incremento en la producción de autoanticuerpos, rasgo característico de esta enfermedad.

Las anormalidades de células T son numerosas e importantes en los pacientes con LEG y son cruciales en la patogénia de la enfermedad, ya que las células T regulan la función de las células B y la producción de la mayoría de los autoanticuerpos patogénicos (107,108).

Entre las alteraciones que se presentan en estos pacientes se encuentra la linfopenia que es frecuente y la cual se relaciona con la actividad de la enfermedad.

Los linfocitos T están disminuidos selectivamente y particularmente aquellos que portan receptores para la fracción Fc de la inmunoglobulina G (células T gama). A su vez la disminución de esas células apoya la noción de que las células supresoras están disminuidas en el LEG ya que se les ha identificado como efectoras de esta función (109,110,111).

La linfopenia de células T es en parte debida a la presencia de autoanticuerpos antilinfocitos. Estos anticuerpos son de clase IgM y selectivamente reaccionan con las células T supresoras y sus precursores, los cuales son eliminados por reacciones citotóxicas dependientes de anticuerpo (112).

Además, se ha encontrado que la respuesta proliferativa en el cultivo mixto autólogo de linfocitos, está deteriorada en el LEG. Esto no solo resulta de un defecto de las células T, sino también de una capacidad estimuladora reducida por parte de la célula B de los pacientes con lupus, a las células T autólogas (113). Entonces, el defecto en la regulación de la respuesta inmune en los pacientes con LEG parece ser debida, tanto a la falta de células T supresoras

como a una alteración de la función de las células B. En las células T se ha reportado un defecto en la producción de interleucina 2 (114, 115,116).

Hay un aumento de la respuesta policlonal de célula B independiente de células T a los antígenos estimuladores, en particular a los que actúan sobre las células B , tal como los lipopolisacáridos bacterianos y, quizás algunos polianiones (94).

Las citotoxicidades natural, la mediada por anticuerpo y la específica están disminuidas en los pacientes con LEG (91, 113,117). Estas funciones responden pobremente a interleuquina 2 (88,89). En el ensayo de una sola célula se observa un defecto intrínseco en la capacidad lítica de las células NK (90).

La importancia de la actividad NK en la patogénesis del LEG, su relación con la actividad de la enfermedad, y las posibles implicaciones en la oncogénesis está por dilucidarse. La localización del defecto en el mecanismo lítico, y la participación de las interleuquinas en los pacientes con LEG permitiría una mejor delineación de las anormalidades intracelulares responsables del defecto en la función citotóxica.

6. HIPOTESIS

La actividad citotóxica anormal o deficiente observada en los pacientes con lupus eritematoso generalizado se logra restablecer, por la acción de diferentes interleuquinas, por lo que en un ensayo de citotoxicidad utilizando células no adherentes (NA) que incluyen a las células NK CD56+, y enfrentándolas a una línea celular sensible a células NK y que además se realicen los ensayos en presencia de suero descomplementado, se asegurará que no se evaluará la citotoxicidad mediada por anticuerpo.

7. OBJETIVOS

Estudiar la función citotóxica de las células no adherentes, NK CD56+, de los pacientes con LEG en condiciones basales, en presencia de suero autólogo y de suero bovino fetal descomplementados y después de estimularlas con rIL2, rIL4, rIL6, rTNF α así como con IL2 + IL4; IL2 + IL6; IL2 + TNF; IL4 + IL6; IL4 + TNF y con IL6 + TNF, se probará su capacidad citotóxica utilizando como células blanco a la línea K562.

Se determinará por citometría de flujo el porcentaje de células CD56⁺ positivas después de la incubación con cada una de las interleuquinas solas o combinadas, así como, en ausencia de ellas.

Se establecerá si existe diferencia en la actividad citotóxica de las células de los pacientes con enfermedad activa o inactiva en condiciones basales y después de haber sido incubadas las células en presencia de las diferentes interleuquinas recombinantes.

8. MATERIAL Y METODOS

8.1 OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES

Las células mononucleares (CMN) fueron obtenidas de la sangre periférica venosa con heparina (10U/ml) como anticoagulante. La sangre se diluyó en un volumen igual de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (PBS). La mezcla se vertió sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala/Winthrop de México) densidad 1.077 gr/ml. Las células se separaron por centrifugación durante 30 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. Los eritrocitos y granulocitos quedaron en la parte inferior del gradiente y las CMN se recuperaron de la interfase (118,119). Estas se lavaron tres veces con PBS por centrifugación a 1,300 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con penicilina (100 UI/ml) estreptomicina (100 µg/ml), L-glutamina (Sigma, 2mM) y suero bovino fetal descomplementado (Sigma) al 10%.

Las CMN se contaron en un hemocitómetro y se les determinó su viabilidad con tinción de azul tripano (Sigma).

En todos los experimentos las CMN fueron depletadas de células adherentes. Para esto, las CMN se ajustaron a una concentración de 10×10^6 en RPMI completo por 1 hr a 37° C en una atmósfera de 5 % CO₂ y 100% de humedad en placas de petri de plástico.

Después de la incubación las células no adherentes fueron recuperadas en el sobrenadante (120), se centrifugaron 10 min a 1400 rpm y se resuspendieron en medio completo. Se determinó su viabilidad por exclusión con azul tripano y con una alícuota de estas células se realizaron frotis para determinar por tinción de

inmunoperoxidasa la cantidad de monocitos presentes en cada muestra.

Las células no adherentes se ajustaron a 2.5×10^6 cels/ml y se incubaron por 18 hrs con las interleuquinas recombinantes correspondiente de acuerdo al siguiente esquema:

Control	Medio completo con suero bovino fetal (SBF) descomplementado.
SA	Medio completo con suero autólogo descomplementado.
IL-2r (Genzyme)	0.5 μ g/ml
IL-4r (Genzyme)	100 UI/ml
IL-6r (Genzyme)	5 UI/ml
TNF (Genzyme)	200 UI/ml
IL-2 (0.5 μ g/ml) + IL-4 (100 U/ml)	
IL-2 (0.5 μ g/ml) + IL-6 (5 U/ml)	
IL-2 (0.5 μ g/ml) + TNF (200 U/ml)	
IL-4 (100U/ml) + IL-6 (5 U/ml)	
IL-4 (100U/ml) + TNF (200 U/ml)	
IL-6 (5U/ml) + TNF (200 U/ml)	

Las dosis de IL2 se establecieron de acuerdo a ensayos de proliferación de células CTLL, la de IL6 utilizando células B9, la de IL4 (121) y TNF (83) de acuerdo a lo señalado en la literatura.

8.2 CELULAS EFECTORAS Y CELULAS BLANCO.

Después de 18 hrs de incubación las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1300 rpm por 10 min a temperatura ambiente para ajustarse a 2.5×10^6 cels/ml en medio completo, considerando

entonces a estas células como efectoras de la función citotóxica. La célula blanco empleada fue la línea K562 obtenida de un derrame pleural de un paciente con eritroleucemia (122). Esta línea celular se mantuvo en crecimiento estacionario en RPMI-1640.

8.3 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD POR LIBERACION DE ^{51}Cr .

La línea K562 se ajustó a una concentración de 2×10^6 células/ml de medio de cultivo y se marcó con $100\mu\text{Ci}$ de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear) durante una hora a 37°C (123,88). Después de esta incubación las células se lavaron tres veces con medio completo, se resuspendieron en el mismo y se incubaron 1 hora adicional con el objeto de disminuir la liberación espontánea del isótopo radioactivo.

Las células se lavaron de nueva cuenta y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células /ml de medio de cultivo. Se cultivaron cantidades crecientes de células efectoras con una concentración constante de células blanco en un volumen final de $200 \mu\text{l}$ en placas de microcultivo de fondo redondo.

Los cultivos se incubaron por 4 horas a 37°C . Al final de este período, las placas se centrifugaron y de cada uno de los pozos se colectaron $100\mu\text{l}$ de sobrenadante en tubos desechables de polipropileno. La radiactividad se midió en un espectrómetro automático gama (Packard).

Como valor de liberación espontánea se consideró el sobrenadante de la línea K562 incubada en ausencia de células efectoras y como valor de liberación máxima el sobrenadante de la línea K562 incubada en $200\mu\text{l}$ de ácido acético al 5% (122,124). el porcentaje de lisis específica se calculó de acuerdo a la

siguiente fórmula.

$$\% \text{ lisis específica} = \frac{\text{cpm experimental} - \text{cpm liberación espontánea}}{\text{cpm liberación máxima} - \text{cpm liberación espontánea}} \times 100$$

La liberación espontánea siempre fue menor al 10% de la liberación máxima. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado con relaciones efectoras : blanco de 50:1 y 25:1 (88).

8.4 CUANTIFICACION FENOTIPICA DE LAS CELULAS NK

Las células que sobraron en cada una de las condiciones se centrifugaron por 10 minutos a 1300 rpm, se resuspendieron y se incubaron por 30 minutos con el anticuerpo monoclonal (Beckton Dickinson) CD56 conjugado con ficoeritrina a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 500 μ l de formol al 3% en PBS para ser analizadas en el citómetro de flujo Facscan (Beckton Dickinson). En cada muestra se contaron 10,000 células y se analizaron con el programa Consort-30, determinando así el porcentaje de células positivas.

8.5 PACIENTES

Se estudiaron 24 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado. Todos reunieron 4 ó mas criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (Tan,1982). En el momento del estudio 15 pacientes tenían datos clínicos de actividad, según el índice de actividad de lupus MEX-SLEDAI (125) y 9 estaban en remisión. Ningún paciente recibía tratamiento a base

de antiinflamatorios no esteroideos, ni corticosteroides ni de inmunosupresores en el momento del estudio.

La edad promedio de las pacientes activas fue de 25 ± 7 años y de las inactivas de 38 ± 13 años. Todas fueron del sexo femenino.

Como grupo control estudiamos 14 mujeres normales, las que tuvieron una edad promedio de 30 años .

8.6 ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos de cada uno de los pacientes se capturaron en una computadora personal IBM a través del programa DBASE III.

Los promedios y las desviaciones estandar de las actividades citotóxicas basales y estimuladas dentro de un mismo grupo y entre grupos se calcularon por el programa estadístico SAS.

Las diferencias entre las condiciones basal y estimuladas dentro de un mismo grupo se establecieron con la prueba estadística de Wilcoxon. Mientras que las diferencias entre cada una de las condiciones entre los controles y los pacientes con LEG activo e inactivo fue establecida por la prueba de U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 ACTIVIDAD NK EN LOS PACIENTES CON LUPUS ERYTEMATOSO GENERALIZADO.

Como puede verse en la Tabla 1 no hubo diferencia en la actividad citotóxica natural (aNK) basal (células no adherentes incubadas con suero bovino fetal "SBF") entre los pacientes lúpicos con enfermedad inactiva y los controles, mientras que la aNK fue menor en los pacientes con lupus en fase activa, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.0003$) al analizarlos con la prueba de Wilcoxon. Cuando las células citotóxicas de los pacientes lúpicos activos e inactivos se incubaron con suero autólogo (SA) descomplementado se encontró una menor actividad citotóxica en los tres grupos, al compararse con la obtenida de las células incubadas en presencia de suero bovino fetal (condición basal) aunque no se alcanzó diferencia significativa (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad citotóxica basal (SBF) y en presencia de suero autólogo descomplementado (SA).

Grupo	SBF X \pm DE & lisis	SA
CONTROL	46 \pm 17	25 \pm 19
INACTIVO	36 \pm 23 N.S.	24 \pm 15 N.S.
ACTIVO	18 \pm 14 p=0.0003	15 \pm 12 N.S.

9.2 Efecto de la preincubación con rIL-2.

Las células de los controles y de los pacientes fueron incubadas en presencia de $0.5 \mu\text{g}$ de rIL2 por 18 hrs. Como se puede ver en la Fig. 1, la interleuquina-2 incrementó la función citotóxica del grupo control (basal $46\% \pm 17\%$ vs estimulada $71\% \pm 18\%$ $p = 0.001$), así como la de los pacientes inactivos ($36\% \pm 23\%$ vs $62\% \pm 21\%$ con una $p = 0.007$) y la de los activos ($18\% \pm 14\%$ vs $43\% \pm 17\%$ $p=0.0007$) (Fig. 1).

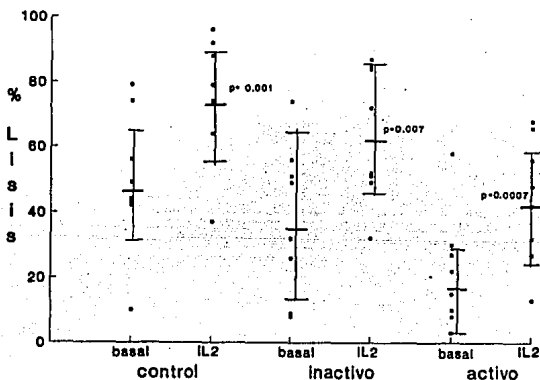


Fig. 1 Efecto de la IL2r ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) sobre la actividad citotóxica del grupo control y de los pacientes con lupus inactivo y activo. Los valores de p resultan de comparar con la prueba de Wilcoxon la condición basal (SBF) *versus* la estimulada (rIL-2).

9.3 Efecto de la preincubación con rIL4, rIL6 y rTNF.

La función citotóxica de las células de los controles y de los pacientes inactivos disminuyó por efecto de la IL4 y la IL6. Esto se encontró al comparar el número de casos con la prueba de Wilcoxon, de las condiciones estimuladas con rIL4 e rIL6 con los obtenidos en condiciones basales (SBF) Tabla 2.

La aNK de las células de los pacientes con enfermedad activa no se vió afectada por la presencia de IL4, IL6 y TNF recombinantes, esto cuando se compararon las células estimuladas con su basal. (Tabla 2).

Por otro lado en siete de los nueve pacientes inactivos cuyas células se estimularon con TNF tuvieron una función citotóxica menor que la basal siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.02$) por la prueba de Wilcoxon.

Tabla 2. Citotoxicidad mediada por IL4r (100U/ml), IL6r (5U/ml) y TNFr (200u/ml) sobre células de individuos normales y de pacientes lúpicos inactivos y activos.

GRUPO	SBF % lisis	IL4 % lisis	IL6 % lisis	TNF % lisis
CONTROL	46±17	42±19 p=0.005	41±17 p=0.01	46±19 N.S.
INACTIVO	36±23	30±18 p=0.01.	31±20 p=0.05	31±19 p=0.02
ACTIVO	18±14	14±10 N.S.	17±12 N.S.	19±16 N.S.

Los valores de p resultan de comparar la condición basal (SBF)

contra la estimulada (IL) entre cada uno de los grupos con la prueba de Wilcoxon.

9.4 Efecto de la preincubación con IL2+IL6, y con IL2+TNF.

Al cultivar las células en presencia de rIL2 + rIL6 y rIL2 + rTNF se encontró aumento de la aNK tanto en el grupo control como en los pacientes, al comparar la condición basal contra la estimulada, siendo la diferencia estadísticamente significativa (Fig.2). No se encontró diferencia al comparar el estímulo obtenido con rIL2 contra sus combinaciones con rIL6 y rTNF (Fig.3) en los tres grupos estudiados. Las células de los pacientes con enfermedad activa lograron alcanzar los niveles normales basales solamente cuando se cultivaron en presencia de IL2 sola o junto con IL6 y TNF (Tabla 3).

Tabla 3. Citotoxicidad mediada por IL2r (0.5µg/ml), IL2 (0.05µg/ml) + IL6r (5U/ml), IL2r (0.5µg/ml) + TNFr (200U/ml).

Grupo	SBF X ± D E % lisis	IL-2	IL2+IL6	IL2+TNF
CONTROL	46 ± 17	71 ± 18 p=0.001	75 ± 17 p=0.002	72 ± 21 p=0.002
INACTIVO	36 ± 23	62 ± 21 p= 0.007	63 ± 21 p= 0.007	69 ± 16 p= 0.007
ACTIVO	18 ± 14	43 ± 17 p= 0.0007	40 ± 20 p= 0.001	46 ± 19 p= 0.001

Los valores de p resultan de comparar dentro del mismo grupo la condición basal vs la estimulada (basal 46 ± 17 vs 71±18 IL2,

basal 46 ± 17 vs 75 ± 17 IL2+IL6 etc.) con la prueba de Wilcoxon.

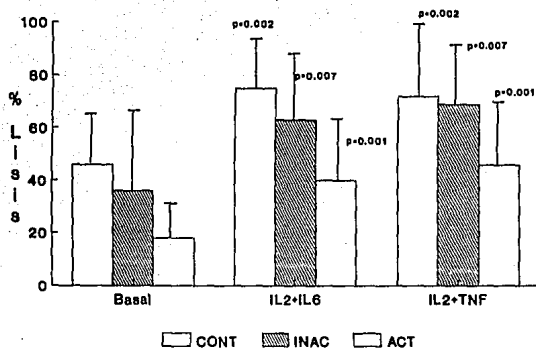


Fig 2. Efecto de la estimulación con IL2r (0.5 μ g/ml) + IL6r (5U/ml) y con IL2r (0.5 μ g/ml) + TNFr (200U/ml), sobre la ANK de las células NA de pacientes lúpicos inactivos y activos.

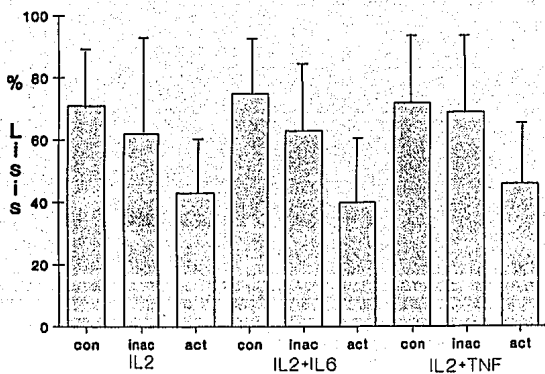


Fig. 3. Comparación del efecto de la IL2r (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en los tres grupos estudiados con la obtenida del estímulo de las células NA con IL2+IL6 e IL2+TNF.

9.5 Efecto de la preincubación con IL4, IL4+IL2, IL4+IL6, IL4+TNF.

Hubo un descenso en la aNK en presencia de IL4 tanto en el grupo control como en los pacientes con LEG en fase inactiva (Tabla 4), así como un claro descenso al comparar IL2 vs IL4+IL2 en los tres grupos estudiados (Fig. 4) con la prueba de Wilcoxon.

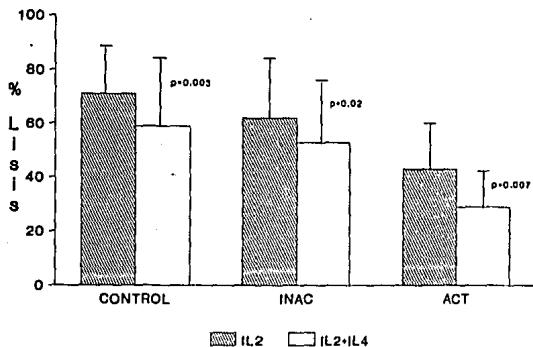


Fig. 4 Efecto de la IL-4r (100 U/ml) sobre la actividad inducida por IL2r (0.5µg/ml) en el grupo control y los pacientes con lupus inactivo (INAC) y activo (ACT). Los valores de p resultan de comparar la actividad inducida por IL2 versus la inducida por IL2+IL4 con la prueba de Wilcoxon.

Se encontró un aumento de la aNK de las células NA de los

Se encontró un aumento de la aNK de las células NA de los pacientes y de los controles después de haber sido estimuladas con IL2+IL4 (Tabla 4).

La FCTN de las células de los controles y de los pacientes inactivos disminuyó después del estímulo con IL4+IL6 (Tabla 4). Mientras que en cinco de ocho pacientes con lupus activo la FCTN fue mayor que la basal (Tabla 4) .

La preincubación de las células de los pacientes con lupus y de los controles con IL4+TNF no afectó la FCTN cuando se compararon los porcentajes de lisis con el basal (incubado con suero bovino fetal) (Tabla 4) .

Tabla 4. Efecto de la estimulación con I14r (100 U/ml), IL4r (100 U/ml) + IL2 (0.5µg/ml), I14r (100U/ml) + TNFr (200 U/ml) sobre la actividad NK.

GRUPO	SBF % lisis	IL4 % lisis	IL4+IL2 % lisis	IL4+IL6 % lisis	IL4+TNF % lisis
CONTROL	46 ± 17	42 ± 19 p=0.005	59 ± 23 p=0.003	45 ± 18 p=0.01	47 ± 21 N.S.
INACTIVO	36 ± 23	30 ± 18 p=0.01	53 ± 23 p=0.007	32 ± 20 p=0.01	34 ± 21 N.S.
ACTIVO	18±14	14 ± 10 N.S.	29 ± 14 p=0.007	15 ± 9 p=0.05	15±11 N.S.

Los valores de p resultan de comparar entre cada uno de los grupos la condición basal versus la estimulada con la prueba de Wilcoxon.

9.6 EFECTO DE LA COMBINACION IL6+TNF SOBRE LA aNK.

En el grupo control y en el de los pacientes con LEG en fase inactiva la combinación de IL6+TNF ejerció un efecto inhibitorio. Esto se observó al compararlo con la FCTN basal (control= basal 46 ± 17 vs IL6+TNF 41 ± 17 ; inactivo= 36 ± 23 vs 30 ± 20) siendo esta diferencia estadísticamente significativa con la prueba de Wilcoxon. (Fig 5).

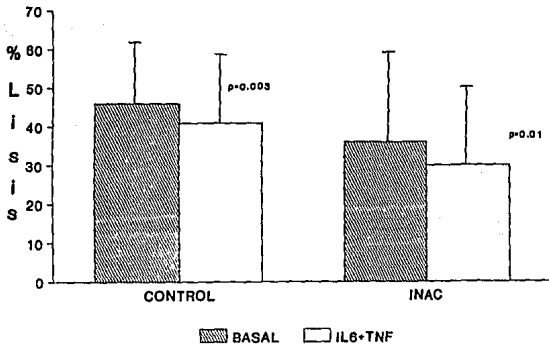


Fig 5. Efecto inhibitorio de IL6r (5U/ml) + TNFr (200U/ml) sobre la actividad NK del grupo control y del de los pacientes con LEG inactivo.

El efecto inhibitorio de IL6+TNF sobre la función citotóxica natural en células normales no se encontró en los pacientes con LEG en fase activa , (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de IL6r (5U/ml) + TNFr (200U/ml) sobre la aNK.

GRUPO	SBF % lisis	IL6 + TNF % lisis
CONTROL	46 ± 17	41 ± 17 p = 0.003
INACTIVO	36 ± 23	30 ± 20 p= 0.01
ACTIVO	18 ± 14	15 ± 15 N.S.

9.7 Análisis por grupo de la FCTN estimulada por ILs.

Los pacientes con lupus activo presentaron una FCTN menor respecto al control cuando se cultivaron en presencia de IL2, IL4, IL-6, IL2+IL4, IL2+IL6, IL2+TNF y IL6+TNF (Fig. 6) así como en presencia de TNF y IL4+IL6 (Fig.7), siendo en todos los casos la diferencia estadísticamente significativa al hacer el análisis con U de Mann-Whitney .

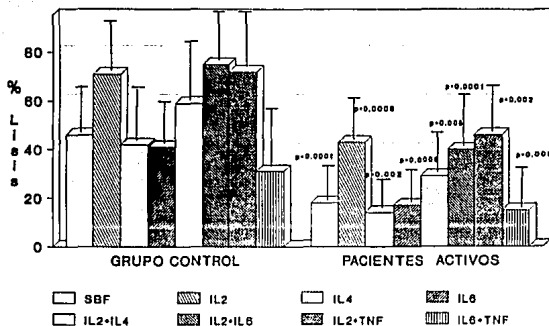


Fig 6. Comparación de la FCTN del grupo control y de los pacientes lúpicos con enfermedad activa. Los valores de p resultan de comparar cada una de las condiciones del grupo control contra su respectiva en el grupo de pacientes con LEG activo con la prueba de U de Mann Whitney.

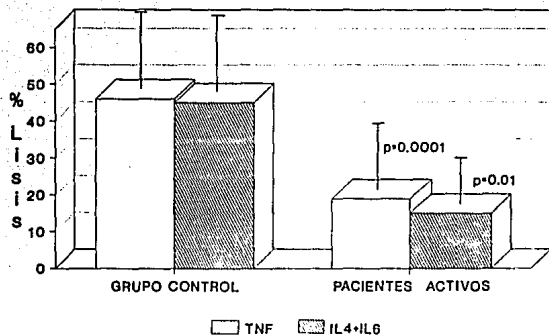


Fig. 7 Actividad NK de los pacientes lúpicos activos después de la incubación por 18 hrs con TNFr e IL4r + IL6r.

Los pacientes con enfermedad inactiva presentaron una función citotóxica natural aparentemente menor aunque la diferencia con respecto al grupo control no fue estadísticamente significativa (U de Mann-Whitney), de hecho el grupo inactivo se comportó de una manera similar al grupo control ya fuera cuando las células efectoras se cultivaron en presencia de las ILs solas (Fig.8) o combinadas (Fig.9).

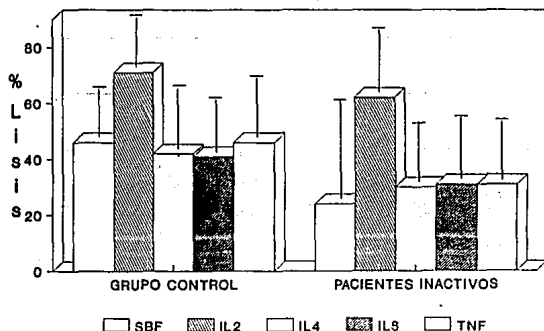


Fig. 8 Comparación de la ANK de los pacientes inactivos y el grupo control después de la incubación de las células NA y las interleuquinas recombinantes.

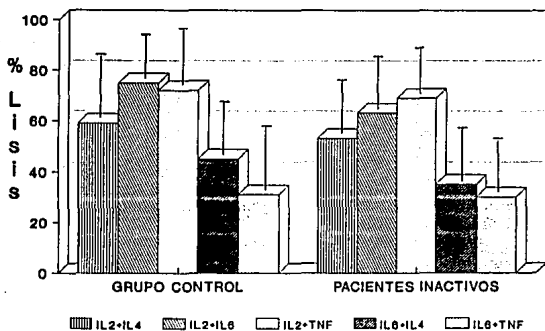


Fig 9. Comparación de la ANK de los pacientes inactivos y el grupo control después de la incubación de las células no adherentes + la combinación de interleuquinas.

9.8 FENOTIPO DE LAS CELULAS EFECTORAS

El 24% de las células no adherentes, de individuos normales expresaron Ag CD56 en su membrana en condiciones basales. En los pacientes con LEG tanto los activos como los inactivos presentaron casi los mismos porcentajes (25% activos, 27% inactivos) (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de células CD56⁺. Células no adherentes incubadas por 18 hrs con suero bovino fetal; IL2r 0.5 µg/ml; IL4r100 UI/ml; IL-6r 5 U.I.; TNF 200 U.I/ml.

GRUPO	SBF	IL-2	IL-4	IL-6	TNF
CONTROL	24	23	23	22	24
INACTIVO	27	29	25	26	25
ACTIVO	25	30	28	27	28

Al incubarse durante 18 hrs con las diferentes interleuquinas se observó que no hubo diferencia en ninguna de las condiciones en el grupo control, así como tampoco en los pacientes inactivos. Mientras que en los pacientes activos hubo un aumento en el número de células positivas después de haberlas incubado en presencia de IL2 (Tabla 6) y de IL6 + TNF (Tabla 7), sin ser la diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 7. Porcentaje de células CD56 después de haber sido cultivadas las células NA por 18 hrs con las diferentes interleuquinas combinadas a la misma dosis que cuando se utilizaron solas.

GRUPO	IL2+IL4	IL2+IL6	IL2+TNF	IL4+IL6	IL4+TNF	IL6+TNF
CONTROL	23	22	23	24	25	23
INACTIV	25	25	25	25	21	25
ACTIVO	26	27	27	27	29	32

10. DISCUSION

La función citotóxica natural se encuentra alterada en diversas enfermedades (88,89,90,91). Se ha observado una disminución de la aNK en sangre periférica de pacientes con varios tipos de neoplasias(3,14). Se han encontrado alteraciones de la misma actividad en enfermedades infecciosas, en pacientes postrasplantados de riñón y de médula ósea, y en las enfermedades con trastornos de la inmunorregulación. Los pacientes con inmunodeficiencias combinadas severas pueden tener una aNK normal o aumentada (16).

En lo que se refiere a las enfermedades autoinmunes se han realizado pocos estudios que muestren como se encuentra la actividad citotóxica en los pacientes con una alta producción de autoanticuerpos y entre los que existen, se observan resultados controversiales (88,89,90,91).

El presente estudio muestra que los pacientes con lupus eritematoso generalizado tienen disminuida su actividad NK (aNK) y que esta anormalidad y su regulación por citocinas predomina como grupo en los pacientes con la enfermedad activa.

Estudios previos han descrito anormalidades en la aNK en los pacientes con LEG. Flad (126), González-Amaro, Alcocer-Varela y cols. (88), Sibbitt (89) y Katz(90) reportaron una actividad citotóxica natural disminuida en pacientes con LEG utilizando ensayos de citotoxicidad con Cr⁵¹. La diferencia de este estudio con en el de González-Amaro es que utilizaron células mononucleares como efectoras y no hacen diferencia entre pacientes activos e inactivos, lo que les hace pensar que todos ellos tienen una actividad citotóxica menor que la de los controles y aunque Sibbitt

(89) hace una mención del grado de actividad de los pacientes, solo incluye tres con actividad media, uno de los cuales estaba recibiendo tratamiento con 20 mg de prednisona y cuatro con actividad moderada, estando dos de ellos con 10 mg de prednidona.

Katz (90) es quien propone que los pacientes con enfermedad activa son los que tienen alteración en su aNK, pero incluye en su trabajo pacientes inactivos con tratamiento así como activos con hidroxicloroquina. En el presente estudio se hizo una diferenciación entre los pacientes activos e inactivos estando todos ellos sin tratamiento y los inactivos al menos con un año de remisión de la enfermedad.

Con el fin de determinar si algún factor del suero era responsable de la aparente disminución de la actividad citotóxica de los pacientes activos, se incubaron las células no adherentes de los tres grupos con suero autólogo descomplementado, y no se encontró ninguna diferencia en los pacientes ya fueran activos o inactivos cuando se compararon sus actividades con las obtenidas de las células incubadas con suero bovino fetal. Esto hace pensar que esta falla no es debida a factores solubles termoestables presentes en el suero, ya que este fue calentado a 56°C por 15 min para descomplementarlo.

Las interleuquinas son polipéptidos que afectan las funciones de diversas células. Entre otras, favorecen la comunicación celular, promueven la síntesis y secreción de otros factores solubles, modulan la expresión de antígenos de superficie, amplifican respuestas inflamatorias y conducen al crecimiento y a la diferenciación celular (41,42).

Las células asesinas naturales (NK) al igual que una amplia

variedad de células se ven afectadas por la presencia de determinadas citocinas. De todas las citocinas estudiadas el efecto mejor conocido y menos controvertido sobre la función citotóxica normal es el que ejerce la IL-2 (73,74,76).

En este estudio cuando las células de los sujetos normales o las de pacientes con LEG se incubaron con IL-2 recombinante se observó un incremento significativo de la aNK sobre células blanco K562, llegando a alcanzar los valores normales basales ($46 \pm 17\%$) en el caso de los pacientes activos (NA+IL2r $43 \pm 17\%$) y comportándose el grupo inactivo de manera similar al grupo control (NA+IL2 control 71 ± 18 , inactivo 62 ± 21 $p=0.3$, U de Mann-Whitney).

La recuperación de la función citotóxica de las células de los pacientes con LEG activo podría permitir, la introducción de la IL-2 como agente terapéutico, de una manera semejante a la que se hace en los pacientes con cáncer (62,69,127).

Este fenómeno de aumento de la aNK en pacientes lúpicos ha sido observado por varios autores (74,76,77,88,89) , en donde el incremento fue encontrado tanto en células no adherentes como en mononucleares con sobrenadantes que contenían IL2. Además, la actividad NK es independiente de la producción de IL-2 (89).

A pesar de que parece ser que la IL2 proveniente del sobrenadante del cultivo de linfocitos, o la producida como recombinante tienen efectos similares, en este trabajo se prefirió el uso de IL-2 recombinante puesto que los sobrenadantes pueden contener a la IL-2 y además otros compuestos que pudieran modular de alguna manera la aNK.

Se conocen pocos trabajos en los cuales se ha estudiado el

efecto de la IL-4 en diversas poblaciones celulares de sujetos normales (121,127,128).

Nagles y cols. (65) analizaron el efecto de la IL-4 (100U/ml) sobre LGL purificados, mientras que Keever y cols. (86), lo hicieron sobre células de médula ósea. En ambos trabajos no se encontró ningún efecto sobre la actividad NK de las células estimuladas.

En el presente trabajo utilizando células NA como células efectoras, tanto en los sujetos controles como en los pacientes con LEG en fase inactiva, la IL4 indujo una disminución de la aNK. Esto no ocurrió en el caso de las células de los pacientes con LEG en fase activa y ya que los pacientes en fase activa tienen anomalías en cuanto a la función de sus células B, y sabiendo que la rIL-4 estimula y regula a las B para que envíen señales a las T y en estas últimas actúa como activador del crecimiento, en particular de las T preactivadas por diversos estímulos, para la producción de IL-2, es de suponer que la IL-2 sintetizada de *novo* pudiera estimular a las células NK, de tal manera que al generarse una mínima respuesta citotóxica, no detectamos una disminución de la aNK inducida por IL-4, o bien que existen mecanismos de protección que evita que la actividad NK disminuya tanto que inhabilite a los pacientes con LEG en fase activa para responder ante aquellos agentes patógenos contra los cuales las células NK funcionan como un primer mecanismo de defensa.

Por otro lado existe un trabajo en donde se reportó que la IL4 al igual que la IL-3, suprimen la actividad citotóxica inducida por IL-2 por parte de células de médula ósea o de sangre periférica,

utilizando K562 como blanco y cultivando las células por 7 días (86). Mientras que Nagler y cols. (85) a pesar de que incuban sus LGL durante 18 hrs con IL-2+IL4 a la misma concentración que en este trabajo, no observaron supresión de la actividad NK inducida por IL-2, sobre las células K562, pero sí sobre las COLO.

Al igual que Keever (86), nosotros encontramos que en los pacientes y en los controles la actividad citotóxica inducida por IL-2 en células NA de sangre periférica es abatida por la presencia de IL-4.

La IL-6 es producida por varios tipos celulares y aunque originalmente fue identificada como un factor de diferenciación de las células B, se ha visto que tiene efecto sobre células hematopoyéticas, de mieloma, fibroblastos y hepatocitos entre otras; además de que aumenta la citotoxicidad por parte de las células T citotóxicas (79,80).

Luger y cols. (79) reportaron que los LGL normales aislados por Percoll, incubados con IL-6 recombinante o derivada de fibroblastos aumentan su función citotóxica utilizando células K562 como células blanco. El mecanismo propuesto para ello es que la IL-6 es capaz de inducir la producción de IL-2 por parte de las células efectoras y que lleva a un incremento en la activación de las células NK. Esto es debido a que al usar anticuerpos anti IL-2, en presencia de IL-6 se bloquea el aumento de la aNK por esta última citocina.

A diferencia de lo ya reportado por Luger (79) y Smith (80) para los LGL y para las T citotóxicas, en nuestro grupo de pacientes se encontró que la IL-6 sola ejerció un efecto inhibitorio sobre la actividad citotóxica de las células NA del

grupo control y la de los pacientes con LEG inactivo a pesar de que se utilizaron las mismas dosis, aunque nuestro sistema de ensayo fue diferente al de Luger ya que éste utilizó linfocitos grandes granulares purificados por Percoll y nosotros usamos células no adherentes.

En los pacientes con LEG activo la IL6 no ejerció ningún efecto, de igual manera como lo observó Smith en su sistema (61). Esto quizás debido a que en nuestros ensayos estaban presentes las células B, es posible que la IL-6 (5U/ml) añadida a las células, haya sido utilizada no solo por las células NK sino también por otras células citotóxicas y por las mismas células B para sufrir diferenciación, puesto que por competencia las células T y B están en mayor proporción que las células NK y pudieron haber utilizado una buena cantidad de la IL-6 añadida. Esto pudo dar como resultado que la actividad citotóxica en estas condiciones no difiriera significativamente de la encontrada solo en presencia de SBF.

Smith 1990 (61), reportó que la IL-6 sola o a bajas dosis de IL-2 sinergiza la aNK de los LGL de sangre periférica inducida por esta última, y propone que la IL-6 provee de una señal independiente de IL-2 y que la IL-6 induce un aumento de la aNK solo a dosis subóptimas de IL-2 (10U/ml).

Cuando células NA del grupo control y las de los pacientes con LEG se cultivaron en presencia de IL6 + IL2 tampoco hubo diferencia en su aNK cuando se comparó con la obtenida de incubar las NA+IL-2. Mientras que sí hubo un incremento estadísticamente significativo en los tres grupos cuando se comparó el porcentaje de citotoxicidad de las células NA cultivadas en presencia de IL-2+IL6 y las de la condición basal (SBF).

Lo anterior hace pensar que se está proponiendo un modelo en donde interactúan las células T, las B y las citotóxicas como ocurre *in vivo* y la diferencia con los otros trabajos probablemente se deba a que no se utilizaron dosis subóptimas de IL-2 como aquellos.

El factor de necrosis tumoral fue originalmente descrito como una citocina citotóxica para ciertas líneas tumorales (53). Posteriormente se encontró que tiene efectos regulatorios sobre el crecimiento, la proliferación y la diferenciación de varios tipos celulares.

En el presente estudio se investigó el efecto del rTNF α sobre las células no adherentes de sujetos normales y pacientes con LEG. Los resultados mostraron que el rTNF α (200 UI/ML) no tuvo efecto en el grupo control y en los pacientes con LEG activo, mientras que los pacientes con LEG inactivo tuvieron una aNK inducida por TNF menor que la basal, lo cual esta en contraposición a lo reportado por Ostensen y Lipsky (1987) (82) quienes encontraron en sujetos normales, que utilizando células no adherentes aisladas con nylon-lana y cultivadas por 18 hrs en presencia de 1000 U de rTNF α hay un aumento significativo de la actividad NK y que cuando se incubaron las células con 100 U de TNF el incremento fue "modesto".

Lo anterior hace pensar que en nuestro caso se utilizaron dosis subóptimas de rTNF α , a pesar de que en algunos sujetos si hubo aumento de la aNK, como grupo no se demostró, o bien que el TNF fue utilizado por otras células además de las NK.

La combinación de rTNF α + rIL-2 aumentó la actividad NK en el grupo control y en los pacientes tanto activos como inactivos, sin

embargo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó el porcentaje de citotoxicidad de las células incubadas solo con rIL2. Por el contrario, Ostensen y cols. (82) reportaron que la combinación de rTNF α + IL-2 promueve un aumento de la actividad citotóxica utilizando dosis bajas de IL-2 (1-10 U/ml), es decir que el TNF ejerce un efecto sinérgico sobre la IL-2.

Los resultados mostrados aquí concuerdan con los de Philip y Epstein (83) quienes no encontraron inducción de citotoxicidad por parte del TNF sobre células K562. Por el contrario Ostensen (82) si encuentra inducción por TNF, y propone que tales discrepancias en los resultados pudieran atribuirse al uso del medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal que pudiera revocar, o enmascarar, el efecto del TNF sobre la aNK.

En nuestro caso quizás no se lograron a estimular las células, ya que la dosis de IL-2 siempre fue la óptima para inducir incremento de la aNK. Sin embargo, la dosis de estimulación de 1000 U/ml de TNF para un sistema in vitro parece ser muy alta. Esto permitiría suponer que la IL2 a dosis bajas actúa como un coestimulador para que el TNF ejersa su efecto. No obstante, en el sistema de células no adherentes de pacientes con LEG y con TNF se podría haber observado tal fenómeno, ya que es conocido que los pacientes con LEG producen menos IL-2 que los normales, y no ocurrió así.

Cuando se incubaron las células normales y las de los pacientes con LEG inactivo con TNF+IL6 se obtuvo un efecto inhibitorio de la aNK. Esto hace pensar que en condiciones normales

y a las dosis utilizadas *in vitro* estas dos citocinas ejercen un efecto regulador sobre la actividad citotóxica .

Cuando las células no adherentes se incubaron en presencia de IL-4+TNF no se detectó ni efecto estimulador ni inhibitorio de la aNK, mostrando que combinadas o cada una por separado, no modulan de ninguna manera la función citotóxica en algunos pacientes.

En lo que respecta al porcentaje de células CD56⁺ , no se encontró diferencia entre la condición basal y la estimulada, es decir después de haber cultivado las células en presencia de las diferentes citocinas en los pacientes con LEG inactivo y en los controles; sin embargo, los pacientes con LEG activo parecen tener un mayor número de células CD56⁺ después de haber incubado las células NA en presencia de IL2 y de IL6+TNF aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Lebow (63) y Robertson (129) han encontrado que después de incubar las células NK con IL2 hay un mayor número de células citotóxicas debido a que se promueve la proliferación de esas células. Lebow (63) postula dos maneras de acción de esta citocina sobre las NK de sangre periférica: una de ellas es induciendo la maduración de las células NK no líticas y la otra induciendo la proliferación de células NK ya maduras (63).

El hecho de no haber encontrado un mayor porcentaje de células CD56⁺ después de haber incubado las células con las diferentes citocinas, o al menos con IL-2, puede ser explicado debido a que el cultivo in vitro fue en un corto plazo (18 hrs), apoyando más la idea de Lebow de que la IL2 promueve a las células no líticas a que maduren a células asesinas competentes justificando esto el aumento

de la aNK.

Así pues a pesar de que las pacientes con LEG activo tienen en general una actividad citotóxica menor que la de las inactivas y las controles, el comportamiento frente a las diferentes citocinas fue semejante. Esto sugiere que aunque está abatida esta función inmune, las células pueden responder a los diferentes estímulos tal y como lo harían los sujetos normales, aunque en menor proporción. Esto en los pacientes con lupus es de gran importancia ya que son varios los sistemas celulares inmunes que se encuentran afectados por la enfermedad y permite suponer que aunque los pacientes tengan una mayor producción de autoanticuerpos y una menor función supresora, las células NK se encargan de regular en cierta manera la aparición de clonas autoreactivas, así como de prevenir la aparición de neoplasias o de infecciones ya que los pacientes lúpicos activos se encuentran inmunodeprimidos; además, a pesar de encontrar disminuida la actividad NK en los pacientes lúpicos, se vio que esta actividad puede ser estimulada por diferentes citocinas obteniendo una respuesta semejante a la de los sujetos normales, lo que abre la posibilidad de utilizar la actividad citotóxica inducida por citocinas, de una manera similar a la empleada en los pacientes con cáncer (128).

11. CONCLUSIONES

La actividad citotóxica de los pacientes con LEG activo fue significativamente menor que la del grupo control, mientras que la de los inactivos se comportó de manera similar a la de los normales.

La IL2 promueve un aumento de la aNK en los tres grupos estudiados de tal manera que los pacientes activos lograron alcanzar niveles normales de citotoxicidad in vitro, ya sea cuando la IL2 se incubó sola o junto con IL6 y TNF; de aquí que se considere que estas ILs no tienen ningún efecto sinérgico o antagónico sobre la IL2r.

Las ILs, 4 y 6 al parecer disminuyen la actividad NK de las células de los pacientes con LEG inactivo y las de los sujetos controles.

El TNF no modifica la aNK de las células de los pacientes activos ni la de los controles.

El efecto de la IL4 sobre la aNK fue inhibitorio en presencia de IL2 en las células de los pacientes con LEG activo o inactivo, sugiriendo que la IL4 puede ser un regulador de los mecanismos de activación por parte de la IL2, no siendo así cuando se incuban las células junto con la IL6 y el TNF.

En el grupo control y en los pacientes con LEG inactivo la IL6+TNF ejercieron un efecto inhibitorio de la aNK. Esto hace

pensar que en condiciones normales y en los pacientes que han recuperado su actividad citotóxica, existen mecanismos de regulación negativa de la actividad citotóxica.

En el tiempo empleado de incubación de las células con las diferentes interleuquinas no se encontró aumento en el número de las células CD56 . Esto sugiere que las citocinas empleadas en tiempos cortos de influencia in vitro, activan algún mecanismo lítico que hace que se pueda promover la citotoxicidad o, por el contrario que no lo modifiquen.

12. REFERENCIAS

1. William E. P: Fundamental Immunology. 2d. Ed. Raven Press. 1989.
2. Abbas, K.A., Lichtman H.A., Pober S.J.: Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders. 1990.
3. Ortaldo R.J. and Herberman, B.R.: Heterogeneity of natural killer cells. Ann. Rev Immunol. 1984, 2: 359-394.
4. Hercend, T., Chmidt R.E.: Characteristics and uses of natural killer cells. Immunol. Today 1988, 9: 291-295.
5. Timonen T., Ortaldo R.J. and Herberman B. R.: Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. J Exp Med 1981, 153: 569-582
6. Herberman B.R.: Natural Killer Cells. Ann. Rev. Med. 1986, 37: 347-52.
7. Trinchieri, G.: Biology of natural killer cells. Adv. Immunol. 1989, 47: 187-373.
8. Reynolds, W.C., Ortaldo, R.J.: Natural killer activity: the definition of a function rather than a cell type. Immunol today. 1987, 6: 172-174.
9. Herberman B.R. Ortaldo R.J.: Natural killer cells: their role in defenses against disease. Science 1981, 214: 24-29.
10. Simmons D. Seed, B.: The Fc γ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. Nature. 1988, 333: 568-570.
11. Lanier L. L. Phillips, H.J.: Natural killer cells. Current Opinion in Immunol., 1992, 4: 38-42.
12. Grabstein K.: Cell mediated cytotoxic response. In : Mischell, B. B., M. eds. Selected methods in cellular immunology. San Francisco. Freeman and Co. 1980, 124-137.

13. Ulberg M., Jondal M.: Recycling and target binding capacity of natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1981, 153: 615-628.
14. Eiguchi de P. K., Alcocer, V. J. : Citotoxicidad natural y células agresoras naturales (NK). *Inmunología* 1990,9 (4): 9-20.
15. Hercend, T. and Schmidt, R.E.: Characteristics and uses of natural killer cells. *Immunol. Today.* 1988 : 291-293.
16. Lavelle, G.W.: The role of natural killer cells in immune surveillance. 1989. *N. Engl. J. Med.* 1989. 320 (26): 1748-1749.
17. Lanier, I. Le M.A., et al.: The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 1986, 136: 4480-4485.
18. Ben, A. M.A., Moiré N. Métiver D.: IL-2 receptors on circulating natural killer cells and T lymphocytes. Similarity in number and affinity but difference in transmission of the proliferation signal. *J. Immunol.* 1989, 142: 490-499.
19. Caligiuri A.M. Zmuidzinas, A. Manley. et al.: Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* 1990, 171: 1509-1526.
20. Ullberg, M. and Jondal, M.: Recycling and target binding capacity of human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1981, 153 : 615-628.

21. Roncarolo, G.M., Bigler M., Haanen A.B.J. et. al.: Natural killer clones can efficiently process and present protein antigens. *J. Immunol.* 1991, 147 : 781-787.
22. Shatter A. and Duggan D.B.: Natural Killer cells. Toward clinical application. *American J. Hematol.* 1985, 18 : 435-443.
23. Harris, D. Jaso-Fridmann L. Devlin B. R. et.al. : Identification of a human natural killer target cell antigen with monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1989, 143: 727-735.
24. Kensy, A.M., Sanchez-Madrid F., Robbins E., et al. : The functional significance distribution, and structure of LFA1, LFA2 and LFA3: cell surface antigen associated with CTL "target" interactions. *J. Immunol.*, 1983, 131: 611-616.
25. Chow, S.C. and Jondal M.: A central role for phosphoinositide hydrolysis in activating the lytic mechanism of human natural killer cells. *Immunology*, 1990, 70: 106-110.
26. Herberman, B.R. and Reynolds W. C.: Mechanism of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Ann. Rev. Immunol.* 1986, 4 : 651-680.
27. Wrigth, S.C. Bonavida, B.: Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity, VII. Functional comparison of human natural killer cytotoxic factor with lymphotoxin and tumor necrosis factor. *J Immunol.*, 1987, 138: 1791-1798.
28. Criasey, A.A. Yamamoto R., Vitt C.R. : A high molecular weight component of the human necrosis factor receptor is associated with cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1987, 84: 3293-3297.
29. Burns, F.G. Begley G.C. Mackay R.A. et al.: "Supernatural" killer cells. *Immunol. Today*, 1985, 6: 370-373.

30. Podack R. E., Hengartner, H., and Lichtenheld G.M.: A central role of perforin in cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 1991, 9: 129-157
31. Podack, E.R., Konigsberg P.J.: Cytolytic T cell- granules: Isolation, structural, biochemical and functional characterization. *J. Exp. Med.* 1984, 160: 695-711.
32. Blumenthal, R.P., Millard, P.J., Henkels, M.P., Reynolds, C. W., P.A.: Liposomes as targets for granule cytotoxicity from cytotoxic large granular lymphocyte tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81: 5551-5555.
33. Young, L.: How lymphocytes kill. *Ann. Rev. Med.* 1990, 41: 45-54.
34. Young, D.E. J. and Liu, Ch-Ch.: Multiple mechanisms of lymphocyte mediated killing. *Immunol. Today* 1988, 9: 140-144.
35. Trapani, J.A., Kwon, B.Y. Kosak, C.A. et.al.: Genomic organization of the mouse perforin protein (perforin) gene and localization to chromosome 10: similarities to and differences from C9. *J Exp. Med.* 1989, 171: 545-57.
36. Shinkai, Y. Yoshida, M.C. Mareda, K. et. al.: Molecular cloning and chromosomal assignment of a human perforin (PFP) gene. *Immunogenetics*, 1989, 30: 452-457.
37. Lichtenheld, M.G. Podack, E.R. : Structure of human perforin gene: A simple gene organization with interesting potential regulatory sequences. *J. Immunol.*, 1989, 143: 4267-4274.
38. Lichtenheld, M.G., Olsen, K. J., Lu, P., Lowrey D.M. et al. : Structure and function of human perforin. *Nature*, 1988, 335: 448-451.
39. Berke, G.: T-cell- mediated cytotoxicity. *Current Opinion in*

- Immuno. 1991, 3: 320-325.
40. Tschopp, J., and Conzelmann A.: Proteoglycans in secretory granules of NK cells. Immunol. Today 1986, 7: 135-136
 41. Gupta S.: Cytokines Molecular and biological characteristics. J. Rheumatol 1988; Suppl., 76: 189-201
 42. Varela M.A.; Vilarriño, I.S.; Freire, C.M. y Roldán V.J. : Acción destructiva de las citokinas en el hueso y articulación. Inflamación 1991, 93: 13-19.
 43. Dinarrello, A.Ch. and Mier, W.J.: Lymphokines. New Engl. J. Med. 1987, 317: 940-945.
 44. Mizel, B.S.: The interleukins. FASEB J., 1989, 3: 2379-2388.
 45. Mosmann, R.T.: Cytokines: is the biological meaning. Current Opinion in Immunol, 1991, 3: 311-314.
 46. Smith A.K.: Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. 1988, 240: 1169-1176.
 47. Arai, K, Lee F., Miyajima A., et al.: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. Annu. Rev. Biochem. 1990, 59: 783-836
 48. Kishimoto T.: The biology of interleukin-6. Blood, 1989, 74: 1-10.
 49. Old, J.Ll.: Tumor necrosis factor. Science. 1985: 630-632.
 50. Burke, F.; Stuart, N.M. Davies, B and Balkwill, F.: The cytokine wall chart. Immunol. Today 1993, 14: 165-170.
 51. Snick, V.J.: Interleukin-6 : an overview. Ann. Rev. Immunol. 1990, 8: 253-278.
 52. Akira, S. Hirano, T., Taga and Kishimoto.: Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). FASEB J., 1990, 4: 2860-2867.

53. Larrick, W.J. and Wrihght C.S.: Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor alfa. FASEB J. 1990, 4: 3215-3223.
54. Kishimoto, T. and Hirano T.: Molecular regulation of B lymphocyte response. Ann. Rev. Immunol. 1988, 6: 485-512.
55. Hirano, T. Akira S, Taga, T. Kishimoto, T.: Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunol. Today. 1990, 11: 443-449
56. Alonso L.J.: Informe sobre la I conferencia internacional sobre factor de necrosis tumoral y citocinas relacionadas. Inmunología. 1988, 7: 99-105
57. Le J. Vilcek, J.: Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab. Inv. 1987, 56: 234-247
58. Swain, L.S.: Lymphokines and the response: The central role of interleukin-2. Current Opinion Immunol. 1991, 3: 304-410.
59. Al-Janadi M. Al-Balla S., Al-Dalaan, A. and Raziuddin. : Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. J. Clin. Immunol., 1993, 13: 58-67
60. Alcocer-Varela, J. Alemán-Hoey, D. and Alarcón-Segovia, D.: Interleukin 1 and interleukin-6 activies are increased in the cerebrospinal fluid of patients with CNS lupus erythematosus and correlate with local late T - activation markers . Lupus 1992, 1: 111-117.
61. DeForge, E.L. Nguyen, T.D. Kunkel,, L.S. y Remick, G.D.: Regulation of the pathophysiology of tumor necrosis factor. Lab. Clin. Invest. 1990, 116: 429-438.

62. Grimm, A.E. Mazumder, A., Zhaang, Z.H. and Rosenberg, A.S.: Lymphokine-activated killer phenomenon. Lysis of natural killer -resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1982, 155: 1823-1841.
63. Grimm, E., Ramsey, M.K., Mazumder, A. et al.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. II. Precursor Phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes memory cytotoxic Thymus- derived lymphocytes, and natural Killer Cells. *J. Exp. Med.*, 1983: 884-897.
64. Henney, S.C; Kuribayashi, K, Kern, E.D. and Gills, S.: Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, 1981, 291: 335-338.
65. Grimm A.E. Robb, J.R. Roth, J.R. Neckers, M.L., Wilson J., D., and Rosenberg, A.S.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* 1983, 158: 1356-1361.
66. Umehara H. and Bloom, E.E.: The IL-2 receptor beta subunit is absolutely required for mediating the IL-2-induced activation of NK activity and proliferative activity of human large granular lymphocytes. *Immunol.* 1990, 70: 111-115.
67. Lebow, T.L., Jewett, A., and Bonavida, B.: Killer cell Recruitment and renewal capacity of purified cytolytic and noncytolytic human peripheral blood natural killer cell subsets. *J. Immunol.* 1993, 150: 320-329.
68. Phillips H.J. and Lanier L.L.: Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution

- of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis. *J. Exp. Med.* 1986, 164: 814-825.
69. Grimm, E. e al.: Lymphokine activated killer cell phenomenon: II. Precursor Phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1983, 157: 884-897.
70. Grimm, A.E. and Rosenberg, A.S.: The human lymphokine-activated killer cell phenomenon. *Lymphokines.* 1984, 9: 279-311.
71. Herberman B,R. et al.: Lymphokine-activated killer cell activity. Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol. Today.* 1987, 8: 178-181.
72. Maghazachi A.A. Vujanovic L.N, Herberman B,R. and Hiserodt, C.J.: Lymphokine-activated killer cells in rats. IV. Developmental relationships among large agranular lymphocytes, large granular lymphocytes, and lymphokine - activated killer cells. *J. Immunol.*, 1988, 140: 2846-2852.
73. Domzig W., Stadle M.B. and Rosenberg B.R.: Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity. *J. Immunol.*, 1983, 130: 1970-1973.
74. Lanier, L.L. Benike, J. Phillips, H.J. and Engleman G.E.: Recombinant interleukin 2 enhanced natural killer cell mediated cytotoxicity in human lymphocyte subpopulations expressing the Leu 7 and Leu 11 antigens. *J. Immunol.* 1985, 134: 794-801

75. Nagler, A. Lanier, L. and Phillips, H.J.: Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16- natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* 1990, 171 : 1527-1533.
76. Itoh K. Tilden, B.A. Kumagai, K. and Balch, Ch.M.: Leu-11+ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin 2 (rIL-2)-induced activated killer (LAK) cells. *J. Immunol.* 1985, 134: 802-807.
77. Trinchieri G. Kobayashi-Matsumoto, M. Clark, C.S. et al.: Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 1984, 160: 1147-1169.
78. Amigorena, S. Bonnerot, C. Fridman H.W. and Teillaud, L-J.: Recombinant interleukin 2-activated natural killer cells regulate IgG2a production. *Eur. J. Immunol.* 1990, 20: 1781-1787.
79. Luger, A.T. Krutmann J. Kirnbauer, R. et al.: IFN-beta 2 augments the activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1989, 143: 1206-1209.
80. Smyth J.M., Ortaldo R.J. Bere W. et al.: IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 1990, 145: 1159-1166.
81. Hartwing M. and Korner J.I.: Generation of lymphokine-activated killer cells in long-term cultures. *Immunol.* 1990, 71: 145-147
82. Ostensen, E. M. Thiele L.D. and Lipsky E.P.: Tumor necrosis factor- α enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1987, 138: 4185-4191.

83. Philip, R. and Epstein B.L.: Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature*. 1986, 323: 86-89.
84. Reiter, Z. Rubenstein M.: Interleukin-1 alfa and tumor necrosis factor-alfa protect cells against natural killer cell-mediated cytotoxicity and natural killer cytotoxic factor. *Cell Immunol*. 1990, 125: 326-336.
85. Nagler A. Lanier, L.L. and Phillips H.J.: The effects of IL-4 on human natural killer cells. A potent regulator of IL-2 activation and proliferation. *J. Immunol*. 1988, 141: 2349-2351.
86. Keever A.C., Pekle, K. Gazzola, V.M., Collins, H.N. Bourhis, H.J. and Gillo, A.: Natural killer and lymphokine activated killer cell activities from human marrow precursors. *J. Immunol*. 1989, 143: 3241-3249.
87. Perussia, B.: Lymphokine-activated killer cells, natural cells and cytokines. *Curr. Opin Immunol*. 1991, 3: 49-55.
88. González-Amaro G. Alcocer-Varela J., Alarcón-Segovia, D.: Natural killer cell activity in the systemic connective tissue diseases. *J. Rheumatol*. 1988, 15: 123-1228.
89. Sibbit, W. Likar, L. Spellman, W.C. and Bankhurst, D.A.: Impaired natural killer cell function in systemic lupus erythematosus. Relationship to interleukin-2 production. *Arth. Rheum*. 1983, 26: 1316-1320.
90. Katz, P. Zaytoun, M. Lee, H.J. et al.: Abnormal natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus: an intrinsic defect in the lytic event. *J. Immunol*. 1982, 129: 1966-1971.

91. Neighbour, A.I., Grayzel, I.A. and Miller, E. A. : Endogenous and interferon- augmented natural killer cell activity of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. studies of patients ewith multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Immunol. 1982, 49: 11-21.
92. Tsokos C. G.: Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus. Introduction. Clinic. Immunol. Immunopathol. 1992, 63: 3.
93. García, Mc. E.: Lupus eritematoso sistémico y vasculitis. Venezuela. 1991. Ed. Universidad de Zulia. pag. 25.
94. Wiedermann, G. and Tappeiner. Current concepts of systemic lupus erythematosus. 1984. Academic Press: 1-11.
95. Pincus, T.: Studies regarding a possible fuction for viruses in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus, Arthritis Rheum. 1982, 25: 847-856.
96. Alarcón-Segovia, D. and Díaz-Joanen, E. Lupus subsets: Relationship to genetic and environmental factors. Sem. Arthritis Rheum. 1980, 10: 18-24
97. Talal, N. : Sex steroid hormones and systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheum. 1981, 24 : 1054-1056.
98. Melez, K.A., Reeves, J.P., Steinberg, A.D.: Regulation of the expression of autoimmunity in NZBxNZW F1 mice by sex hormones. J. Immunophatol. 1979, 1: 27-42
99. Roubician, J.R., Pappoian, R., Talal, N.: Androgenic hormones modulate antibody responses and improve survival in murine lupus, J. Clin. Invest. 1977, 59: 1066-1070

100. Pariser, K, Gell, J, Gelfand, JA, et al.: Pilot studies in the use of danazol in lupus erythematosus. Proceedings of the 15th International Congress of Rheumatology, abst. 483, 1981.
101. Lewkonja, R.M.: The clinical genetics of lupus. *Lupus*, 1992, 1: 55-62.
102. Granados, J. y Alarcón-Segovia D.: Immunogenética de las enfermedades del tejido conectivo. en: *Enfermedades autoinmunes del tejido conectivo*. Eds. Hughes, G. y Kamashta M. Ed. Doyma. 1993: 1-10.
103. Gammon W.R Heise E.R., Burke W.A. et al. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II associated. *J. Invest. Dermatol.* 1988, 91: 228-232.
104. Fujisaku A. Barton-Frank M, Neas B, Reinclin M. Harley J.B.: HLA-DQ gene complementation and other histocompatibility relationships in man with the anti-Ro/SSA autoantibody response of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 1990, 86: 606-611.
105. Alarcón-Segovia, D.: Las enfermedades del tejido conectivo como trastornos de la inmunorregulación. *Acta Med. Col.* 1982, 7: 261-265.
106. Reichlin, M.: Current perspectives on serological reactions in SLE patients. *Clin. Exp. Immunol.* 1981, 44: 1-10
107. Tsokos C.G.: Lymphocyte abnormalities in human lupus. *Clin. Immunol. Immunopath.* 1992, 63: 7-9.

108. Kammer, M. G. and Stein, L.R.: T lymphocyte immune dysfunction in systemic lupus erythematosus. *J. Lab. Clin. Immunol.* 1990, 115: 273-281.
109. Alarcón S.D.: Circuitos de inmunorregulación en lupus eritematoso generalizado. *Inmunología Clínica.* 1983, 83: 243-261.
110. Steinberg D.A. Gourley F.M. Klinman M.D. et al.: Systemic Lupus erythematosus. *Ann. Int. Med.* 1991, 115: 548-559.
111. Harley B.J. and Scofield, H.: Systemic lupus erythematosus: RNA-protein autoantigens, models of disease heterogeneity, and theories of etiology. *J. Clin. Immunol.* 1991, 11: 297-316.
112. Sanaka T., Steinberg, A.D. Reeves, J.P. et al.: Studies in immune functions of patients with systemic lupus erythematosus. Complement-dependent immunoglobulin M anti-thymus-derived cell antibodies preferentially inactivate suppressor cells. *J. Clin. Invest.* 1979, 63: 954-965
113. Alarcón-Segovia D., Alcocer-Varela, J., Díaz-Joanen, E.: The connective tissue diseases as disorders of immune regulation. *Clin Rheum. Dis.* 1985, 11: 451-469.
114. Alcocer-Varela J., Alarcón-Segovia D.: Decreased production of and response to interleukin 2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 1982, 69: 1386-1392.
115. Handwerger, S.A.: Lymphocyte biology in lupus. *Curr. Op. Rheumatol.* 1990, 2: 749-761.
116. Linker-Israeli, M.: Cytokine abnormalities in human lupus. *Clin. Immunol. Immunopath.* 1992, 63: 10-73.

117. Flad D.H. Lange, a. Havel, A. Jacak, A. et al. : Natural killer cells and macrophages in SLE. Recent Advances in SLE. 1984: 98-111.
118. Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytic from human blood. scand. J. Lab. Invest. Suppl. 1968, 21: 77-89.
119. Niku, S.D. Hoon, D.S.B., Cochran, A.J. and Morton, D.L.: Isolation of lymphocytes from clotted blood. J. Immunol. Methods. 1987, 105: 9-14.
120. Edelson, P.J. and Cohn, Z.A.: Purification and cultivation of monocytes and macrophages. In vitro methods in cell mediated and tumor immunity (B.A. Bloom and J.R. D. eds). 333-340. Academic Press, San Diego.
121. Spits, H. Yssel, H., Paliard, X. et al. : IL-4 inhibits IL-2 mediated induction of human lymphokine activated killer cells, but not the generation of antigen specific cytotoxic T lymphocytes in mixed leukocyte cultures. J. Immunol. 1988, 141 : 29-36.
122. Korzeniewski and Callewaert M.D.: A simple and economical device for the rapid collection of multiple supernates from cytotoxicity experiments. J. Immunol. Methods. 1982, 50: 1-9.
123. Cerottini J.C. and Brunner T.K. : In vitro assay of target cell lysis by sensitized lymphocytes. In: Bloom B.R., Glade P-R. eds. in vitro methods in Cell-mediated immunity. Academic Press, New Yorks. 1971.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

124. Thorn R.M. and Henney C.S. : Kinetics of analysis of target cells destruction by effector T cells. I. Delineation of parameters related to the frequency and lytic efficiency of killer cells. *J. Immunol.* 1976, 117: 2213-2219.
125. Guzmán, J. Cardiel, M. Arce-Salinas A. et al. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus prospective validation of 3 clinical indices, *J. Rheumatol.* 1992, 19: 1551-1558.
126. Rosenberg, A.S. and Lozte M. Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 1986, 4: 681- .
127. Peace, A., Kern E.D. Schultz, R.K. et al.: IL-4 induced lymphokine-activated killer cells. Activity is mediated by phenotypically distinct natural killer cells- like and T cell-like large granular lymphocytes. *J. Immunol.* 1988, 140 : 3679-3685.
128. Ballas, K.Z. and Rasmussen, W.: Lymphokine-activated killer cells. VII. IL-4 induces an NK1.1⁺ CD8 α ⁺B⁻ TCR- α B B220⁺ lymphokine-activated killer subset. *J. Immunol.* 1993, 150: 17-30.
129. Robertson, J.M., Manley J. T. Donahue, C. et al.: Costimulatory signals are required for optimal proliferation of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1993, 150: 1705-1714.