

11282

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

1
2a)

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

**INTERLEUQUINA 2 EN
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO.
ESTUDIO A LARGO PLAZO Y
SU RELACION CON OTRAS CITOCINAS**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS

Carlos
PRESENTA
JORGE ALCOCER VARELA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO D.F.

MAYO 1994.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

SUMMARY

Since 1982, when we and others reported a defect in the production of, and response to IL-2 by MNC from SLE patients, the expression of cytokines in this disease has become the object of numerous studies. Some of the T cell abnormalities found in SLE patients can be attributed to a decreased activity of this cytokine, which in SLE seems to be an important alteration of the immunoregulation. Although the origin of this abnormality is unknown, several

SUMMARY

Since 1982, when we and others reported a defect in the production of, and response to IL-2 by MNC from SLE patients, the expression of cytokines in this disease has become the object of numerous studies. Some of the T cell abnormalities found in SLE patients can be attributed to a decreased activity of this cytokine, which in SLE seems to be an important alteration of the immunoregulation. Although the origin of this abnormality is unknown, several mechanisms have been proposed to explain it: a) a primary defect of CD4 cells, b) suppressive effect of the activity of IL-2 by CD8 cells or by specific antibodies against IL-2, c) exhaustion of T cells due to their activation in vivo, and d) deficiency of other cytokines that participate in T cells activation.

IL-2 has been proven to be a defective element in SLE immune regulation. However, its course in time is unknown. We have studied its production and cellular response in peripheral blood cells of 30 SLE patients and 12 healthy subjects. In addition, we studied the spontaneous and LPS-induced production of IL-1 which have been found increased and lowered respectively in untreated SLE patients. Patients were studied at the onset, when still untreated, and at 1, 2, 6, 12, 18 and 24 months. At the onset 18 had active disease and 12 were in remission. The decreased proliferative response of T cells to IL-2, and the deficient production of IL-1 upon LPS induction became normal after 6 months treatment whereas the expression of high affinity IL-2 receptors took 18 months to become normal and the deficient production of IL-2 took two years. Despite clinical remission, the decreased capacity of T cells to absorb IL-2 persisted abnormal for 2 years. Our data suggest that in SLE the defect in utilization of IL-2 by T cells is more profound than that of its production and that this is influenced by the spontaneous production of IL-1, suggestive of in vivo activation of monocytes persists even in remission. Looking for the participation of other T cell activation molecules we found that when we cultured T cells from SLE patients with anti-CD28, there was an increase in the secretion of IL-2, which was greater in the cells from patients with active than in those from inactive disease. These data suggest that CD28 might play a central role in the defective immune response observed in SLE patients.

The existence of several major types of murine cloned CD4+ T cells has been well documented. Th1 cells secrete interleukin-2 and interferon gamma but not interleukin-4, interleukin-5, interleukin-6, or interleukin-10 and are able to mediate delayed-type hypersensitivity reactions. Th2 cells secrete interleukin-4, interleukin-5, interleukin-6, and interleukin-10 but not interleukin-2 or interferon gamma and preferentially help in the activation of B cells. Th0 cells can secrete cytokines, whereas memory T cells high levels of interleukin-4 and gamma interferon. The requirement for T cells in the development of SLE has led to the idea that T cells are major contributors in the development of polyclonal B-cell activation and autoantibody production, most likely through the secretion of Th2 cytokines. In support this idea, we have found: a) both CD4+RO+ and CD4+RO-T cell subsets produce IL-2. b) CD4+RO-T cell subset is the best IL-2 producer by normal cells. c) CD45RO marker does not help to define the IL-2 low production observed in SLE patients. d) CD4+RO+ T cell subset is the main IL-4 producer under PHA or anti-CD3 stimulation by normal cells. e) CD4+RO+ T cells from SLE patients produce spontaneously high levels of IL-4. f) preliminary results demonstrate the spontaneous expression of the IL-4, IL-6 and IL-10 genes by that CD4+RO+ T cell subsets in SLE, and this may contribute to the B cell hyperactivity in enhanced antibody synthesis characteristic of this autoimmune disease.

These findings may help to understand the role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.

SECRETARIA DE SALUD

JURADO

PRESIDENTE: Dr Ruy Pérez Tamayo
SECRETARIO: Dr Roberto Kretschmer
1er.VOCAL: Dr Donato Alarcón Segovia
2do.VOCAL: Dr Librado Ortiz Ortiz
3er.VOCAL: Dr Sergio Estrada Parra

SECRETARIA DE SALUD

**Esta tesis se realizó en el
Departamento de Inmunología y Reumatología del
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán
bajo la dirección del Dr. Donato Alarcón Segovia.**

RESUMEN

A partir de 1982, en que nuestro grupo y otros informaron que las células mononucleares de pacientes con LEG eran deficientes en la producción de - y en la respuesta a- Interleuquina 2 (IL-2), la expresión de citocinas ha sido el objetivo de numerosos estudios. Aunque no se conoce la causa de esta anomalía, se han planteado varios mecanismos para su explicación: a) un defecto primario de las células CD4, b) una acción supresora de la actividad de IL-2 por las células CD8 ó por anticuerpos específicos contra IL-2, c) el cansancio de las células T resultante de su activación in vivo y d) un defecto de otras citocinas que participan en la activación de las células T. Para responder algunas de estas preguntas durante los últimos 3 años analizamos en detalle diferentes parámetros que miden la actividad de IL-2 en células de sangre periférica en pacientes con LEG. Con fines de esta tesis presentaré tres grupos de experimentos: i. seguimiento longitudinal del estudio de IL-2. ii. participación de CD28 en la producción de IL-2. iii. análisis de las subpoblaciones T CD45 en la producción de IL-2 y de IL-4.

De las 7 mediciones estudiadas, 5 de ellas (la deficiente producción de IL-2, la expresión disminuída de receptores de alta afinidad, la pobre capacidad de absorción de IL-2, la mayor producción basal de IL-1 y la baja producción ante el estímulo con LPS) tuvieron una correlación significativa ($p < 0.01$), con la actividad de la enfermedad.

La evolución clínica de los pacientes con lupus activo, fue hacia la mejoría. Los pacientes con lupus activo revelaron una disminución progresiva del número de mediciones inmunológicas anormales, hasta llegar en promedio a 1.6 ± 1.0 al término del estudio. Por otra parte, en los pacientes con lupus inactivo también disminuyó el número de las mediciones anormales, aunque se observaron oscilaciones entre 2 y 3 mediciones alteradas. En los pacientes con lupus activo la pobre respuesta proliferativa de las células T y la producción deficiente de IL-1 al estímulo con LPS se corrigieron al cabo de 6 meses de tratamiento; al año lo hizo la producción espontánea de IL-1, mientras que la expresión de receptores de IL-2 de alta afinidad (post tratamiento con pronasa) lo hizo a los 18 meses y la deficiente producción de IL-2 a los 2 años. La pobre capacidad de absorber IL-2 por las células T de los pacientes persistió, pese remisión clínica, aún después de 2 años, .

Al coestimular con el Ac anti-CD28, en todos los casos se observó un incremento en la secreción de IL-2. Los linfocitos de pacientes con enfermedad activa tuvieron un incremento de 81% en la producción de IL-2 al cultivarse con anti-CD28. Este incremento fue de 48 % en los pacientes con lupus inactivo y 40 % en las células de individuos normales.

Se observó una disminución significativa ($p < 0.01$ en todos los casos) en las células CD4+, CD45RO+ y CD45RO- de los pacientes con LEG, al compararse con los testigos. Al segregarlos de acuerdo a su actividad clínica, los pacientes con enfermedad activa presentaron las cifras más bajas.

Al igual que las células T CD45RO+, las CD45RO- estimuladas de los pacientes produjeron menos IL-2 que las células T de los controles y la disminución también correlacionó con la actividad.

Las células T CD45RO+ del grupo total de pacientes con LEG produjeron de manera espontánea significativamente más IL-4 que las CD45RO+ de los controles (6.7 ± 3.1 U/mL, contra 0.53 ± 0.4 U/mL, $p < 0.001$). Esta diferencia fue a expensas de las células T CD45RO+ de los pacientes activos, ya que éstos produjeron significativamente más IL-4 que las células T CD45RO+ de los pacientes inactivos (9.1 ± 3.0 U/mL contra 4.5 ± 0.9 U/mL, $p < 0.01$).

Las células T CD45RO+ de los pacientes con lupus activo, estimuladas con PHA, produjeron significativamente menos IL-4 que las de los pacientes inactivos y de los controles (22.5 ± 7 U/mL, 38.1 ± 7.5 U/mL y 38.5 ± 6.7 U/mL respectivamente, $p < 0.05$). Las células T CD45RO+ estimuladas con anti-CD3 de los pacientes activos se comportaron de manera similar a las estimuladas con PHA (29.1 ± 5.2 U/mL contra 37.7 ± 6 U/mL de los pacientes inactivos y 40.5 ± 2 U/mL de los controles, $p < 0.05$). No hubo diferencia entre la producción de IL-4 por las células T CD45RO+ estimuladas con PHA o con anti-CD3 de pacientes inactivos y de controles. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con lupus hubo expresión genética de IL-4. Al extender estos estudios a las subpoblaciones CD45RO, se encontró expresión del gene de IL-4 en las células CD45RO+ de 4 de 5 pacientes con lupus activo, no así en las CD45RO- de los mismos pacientes.

ABREVIACIONES

AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
B7	Ligando de CD28
CMN	Células Mononucleares
cDNA	DNA complementario
IL	Interleuquina
mAc	Anticuerpo monoclonal
MC	Medio Completo (RPMI-1640 suplementado con 5% de SBF, 100 µg de estreptomina, 100U de penicilina y 2mM de glutamina)
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
TH1,TH2	Subpoblaciones T de ayuda (1 y 2)
rIL-2	Receptor de IL-2
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TGF-β	Factor Transformador del Crecimiento β

INTRODUCCION

Durante los últimos años numerosos estudios han evaluado el sistema inmune de los pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG). La mayoría de estos trabajos han tratado de identificar alteraciones de la inmunorregulación en las células de estos pacientes. Esta enfermedad autoinmune se caracteriza por presentar alteraciones en el número y funciones de las células T inmunorreguladoras con activación policlonal de las células B y la resultante producción de numerosos autoanticuerpos (1-3). Los linfocitos T juegan un papel importante en la patogenia de ésta y otras enfermedades autoinmunes. Los principales hallazgos que sustentan este concepto son: la alta frecuencia con que se observa linfopenia T (a expensas principalmente de las subpoblaciones CD4⁺ y CD45⁺), la cinética anormal en la reacción mixta linfocitaria autóloga, los diferentes defectos en las funciones supresoras, tanto en su fase inductora como efectora, las anomalías en la expresión de moléculas de activación T celular y las diferentes alteraciones en la expresión de citocinas (4-6).

Hay al menos tres posibles explicaciones para esta gama de alteraciones observadas en las células T de pacientes con LEG: 1) La existencia de señales inhibitorias provenientes de células supresoras. 2) Una alteración de la regulación que proveen las citocinas, en particular aquellas relacionadas con eventos tempranos de los mecanismos de activación celular. 3) La permanente activación de células T, desencadenando un estado "exánime" o de cansancio celular, como fue descrito por Huang y colaboradores (7-9). Algunos de estos cambios pueden ser atribuidos a una disminución en la actividad de la interleuquina 2 (IL-2) que en el LEG parece constituir una importante alteración de la inmunorregulación (7-12). La expresión de citocinas ha sido el objetivo de numerosos estudios desde 1982, en que nuestro grupo y otros informaron que las células

mononucleares de sangre periférica de pacientes con LEG eran deficientes en la producción de, y en la respuesta a, Interleuquina 2.

Aunque no se conoce la causa de esta anomalía, se han planteado varios mecanismos para su explicación: a) un defecto primario de las células CD4, b) una acción supresora de la actividad de IL-2 por las células CD8 ó por anticuerpos específicos contra IL-2, c) el cansancio de las células T resultante de su continua activación *in vivo* y d) un defecto de otras citocinas que participen en la activación de las células T (7-12).

La IL-2 es una citocina sintetizada y secretada por las células T una vez activadas mediante antígenos o mitógenos, en presencia de otro mediador derivado de monocitos, la IL-1. *In vitro*, la IL-2 favorece el mantenimiento a largo plazo de células T con funciones de ayuda y con actividad citotóxica y potencia la función citotóxica natural. La IL-2 se ha caracterizado bioquímicamente, habiéndose logrado su clonación molecular. Se sabe que está codificada por un sólo gene, situado en el cromosoma 4 humano (13). Actúa además sobre otras células del sistema inmune como: timocitos inmaduros, linfocitos B, macrófagos, células NK, células LAK y oligodendrocitos, lo que sugiere su participación en la regulación del sistema nervioso central.

Para ejercer sus efectos biológicos, la IL-2 debe interactuar con receptores membranales de alta afinidad, presentes en mayor o menor cantidad en las células antes mencionadas. Los receptores de IL-2 (rIL-2) se encuentran en 3 formas, dependiendo de su capacidad de unión a la IL-2: de alta, intermedia y baja afinidad, con constantes de asociación respectivas de 10^{-11} M, 10^{-9} M y 10^{-8} M. Está formado por 3 cadenas: la alfa (ó antígeno TAC, p55) que constituye la forma de baja afinidad y que no participa en el proceso de internalización de IL-2 ni en los eventos de

"transducción" a menos que se asocie con otro componente de la membrana linfocitaria, identificado como la cadena beta (p70-75) (13-14). Esta cadena por sí misma constituye la forma de afinidad intermedia y, al asociarse con la cadena alfa conforma el receptor de alta afinidad para IL-2. Al aislarse recientemente el DNA complementario para la cadena beta, se conoció que la estructura primaria de esta molécula no tiene homología aparente con ningún otro receptor celular. A diferencia de la cadena alfa, tiene una región citoplásmica extensa en la que descansan los dominios que se encargan de la señales intracelulares y de transducción. Una tercer subunidad, la cadena γ fue identificada hace unos meses por investigadores japoneses (15) quienes mostraron que es un componente indispensable del receptor funcional de IL-2 (Figura 1).

Por otro lado, se ha descrito una serie de moléculas llamadas de activación, que se expresan en diferentes fases del ciclo celular linfocitario. Algunas de ellas se han estudiado en san-

gre periférica de pacientes con lupus habiéndose encontrado que su expresión está en relación inversa con la capacidad celular de producir IL-2 (16-17), lo que apoya el concepto de activación *in vivo* de los linfocitos T de pacientes con lupus. CD28 (PM 45 KDa), otra de estas moléculas, se expresa como homodímero en la mayoría de las células T. El Ag CD28 funciona como regulador de la activación, interviene en la transcripción genética de varias citocinas y en la estabilización del RNA que las codifica. El agregar mAe anti-CD28 a células T previamente activadas a través de su receptor antigénico, aumenta en forma importante el RNA mensajero y la secreción de diversas citocinas, i.e., la IL-2, factor de necrosis tumoral α , factor estimulante de colonias, interferon- γ (IFN- γ), y linfoxina (18). Se ha propuesto que la participación de CD28 resulta en una mayor secreción de citocinas debido a que estabiliza sus transcritos e incrementa la síntesis de éstos, con lo cual la producción de citocinas se torna de autócrina en parácrina (19).

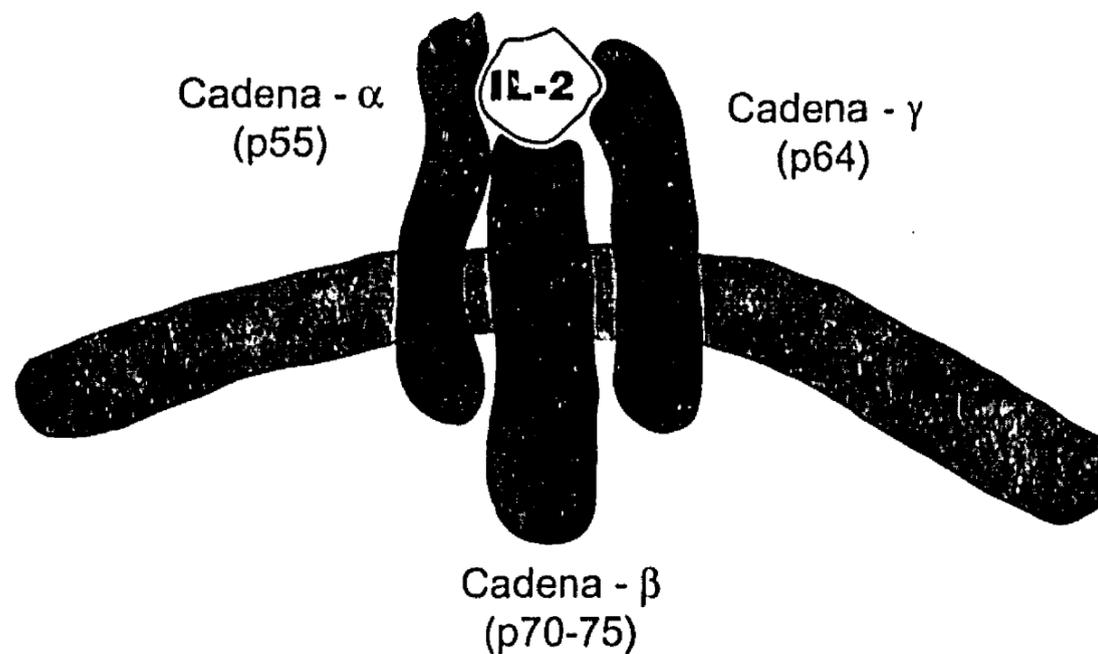


Figura 1. Representación esquemática del receptor de IL-2.

Algunos estudios muestran que en los pacientes con LEG, las células T CD4+ CD45RA-/RO+ se encuentran aumentadas y las CD4+ CD45RA+/RO- disminuidas, al compararlas con las células CD4+ de individuos con otras enfermedades autoinmunes y de sujetos sanos, y que estas alteraciones correlacionan con la actividad de la enfermedad. Sin embargo, en estas publicaciones no se menciona la producción de citocinas por dichas sub-poblaciones (25-26).

Aún no se ha definido con claridad cual subpoblación es la responsable de la deficiencia de IL-2 y tampoco cual es la que produce IL-4, aunque hay estudios de su mayor producción por células T de pacientes con LEG y de ratones con lupus (27-29).

Por lo tanto, estos se convirtieron en otros objetivos de nuestro estudio.

Recientemente se encontró que la producción de IL-2 y la eficiencia de los rIL-2 de células de pacientes con LEG pueden mejorarse *in vitro* al cultivarse en presencia de un inmunomodulador sintético (30). Sin embargo, no se conoce cual es el comportamiento de estos defectos a través del tiempo, sus modificaciones con el tratamiento a base de corticoesteroides y/o inmunosupresores, su relación con el estado de actividad clínica así como su interacción con otras citocinas.

Para tratar de responder algunas de estas preguntas analizamos en detalle durante los últimos 3 años algunos parámetros que estiman la actividad de IL-2 en células de sangre periférica de pacientes con LEG. Con fines de esta tesis presentaré tres grupos de experimentos: i. seguimiento longitudinal del estudio de IL-2. ii. participación de CD28 en la producción de IL-2. iii. análisis de las subpoblaciones T CD45 en la producción de IL-2 y de IL-4.

MATERIAL Y METODOS

En total se estudiaron 76 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado que cumplieran al menos cuatro de los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (antes Asociación Americana de Reumatología). (31) Todas fueron mujeres, con edad promedio de 34.4 años (límites de 18-54). Al entrar al estudio, ningún paciente recibía tratamiento a base de antiinflamatorios no esteroideos, corticosteroides o inmunosupresores.

Estudiamos en forma longitudinal 30 pacientes con edad promedio de 38.3 años (de 22 a 54). En 18 de los pacientes la enfermedad se encontró activa y requerían tratamiento; sin embargo, los estudiamos antes de iniciarlo. En el resto, la enfermedad estaba inactiva, al menos en los 12 meses previos al estudio.

Los pacientes fueron valorados al inicio, al mes, a los dos, seis, 12 y 24 meses. En cada ocasión se obtuvo sangre venosa periférica (60-80 ml) y se evaluó su actividad clínica en base a una escala de 32 puntos de acuerdo al índice Mex-SLEDAI (32).

Los testigos fueron 12 voluntarias sanas con promedio de edad de 38.7 años y con límites de 22 a 50 años, que se estudiaron a los mismos intervalos de tiempo.

Separación de las células

Las células mononucleares (CMN), se obtuvieron por gradientes de Ficoll-Hypaque y fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% de suero bovino fetal (SBF Gibco, Grand Island, NY). Las células adherentes se obtuvieron después de su cultivo durante 2 horas en cajas de Petri y colectadas mediante un pipeteo vigoroso. Las células T se separaron por roseteo de las células no adherentes con eritrocitos de carnero, de acuerdo a técnicas previamente publicadas (6,30). La población de células T contenía más de 94% de células CD3+.

estimado mediante inmunofluorescencia indirecta con el mAc anti CD3 (Beckton Dickinson, San Jose, CA).

Obtención de las subpoblaciones T CD45RO+ y CD45RO-

Se realizó mediante "pegamiento" al anticuerpo específico: Se diluyó el anticuerpo anti-IgG de ratón (SIGMA) a 10 µg/mL en Tris-Cl 0.05 M y pH 9.5. Se añadieron 10 mL a una caja de Petri y se incubó durante 40 min a temperatura ambiente ó 24 horas a 4°C. Dos a 3 x 10⁷ células T se resuspendieron en una solución de anticuerpo monoclonal anti-CD45RO (DAKO, AMAC) a una concentración de 10 µg/mL. Se incubó la suspensión celular en hielo por 30 min y mientras tanto se retiró el anticuerpo anti-ratón no unido a la placa. Esta se lavó 3 veces añadiendo 10 mL de PBS con 5% de SBF. Las células T se añadieron en 10 mL de PBS-SBF 5%, incubándose por 60 minutos a 4°C. Las células no-adherentes se recolectaron pipeteando suavemente el fluido de la placa, lavándola con 10 mL de PBS-SBF 5% (4°C). Se examinó la placa al microscopio invertido hasta haber lavado todas las células no-adherentes. Las células adherentes se obtuvieron añadiendo de 10 mL de PBS-SBF 1% (15-20°C) y raspando con espátula. El lavado se repitió de 2 a 3 veces o hasta que no se observaran más células al microscopio invertido. Ambas subpoblaciones se resuspendieron en RPMI libre de suero, se contaron y se determinó viabilidad por exclusión con azul tripan.

Las subpoblaciones T CD45RO+ y CD45RO- se cultivaron durante 48 h en presencia o ausencia de PHA (2 µg/µL) ó de anti-CD3 inmovilizado (1 µg/µL). Los sobrenadantes obtenidos se congelaron a -70°C hasta ser probados en su contenido de IL-2 e IL-4 mediante el bioensayo específico.

Producción de IL-2

Las células T normales y las de los pacientes con lupus se incubaron con 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, Sigma Chemicals, St Louis, Mo, USA). Después de 3 hrs de incubación en medio completo, (MC, RPMI-1640 suplementado con 5% de SBF, 100 mg de estreptomina, 100 U/ml de penicilina y 2mM L-glutamina), las células se lavaron 2 veces y se resuspendieron en un volumen original de MC. Después de 48 hrs en cultivo, las células se sedimentaron por centrifugación y los sobrenadantes se filtraron (0.22 µm Millex filters (Millipore Corp., Bedford, MA) y se almacenaron a -70°C hasta el momento de ser probados.

En algunos experimentos, para estudiar el efecto de anti-CD28, las células se activaron con anti-CD3 inmovilizado en el pozo de cultivo (0.5 µg/µl) y cultivadas en presencia o ausencia del mAc anti-CD28, 9.3 (dilución 1/1000 de ascitis). Los Ac se usaron a diluciones óptimas de ascitis para la detección de proliferación celular, la que se midió por medio de incorporación de timidina marcada, en ensayos estandarizados a los 2, 4 y 6 días de cultivo. Para la producción de citocinas se cosecharon los sobrenadantes a las 48 hrs de cultivo.

Producción de IL-1

Las células adherentes (2×10^7 /ml) se incubaron durante 20 hrs en presencia o ausencia de 20 ng/ml de lipopolisacárido libre de endotoxinas (LPS, donado gentilmente por G.Moller, Universidad de Estocolmo, Suecia). Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación, se filtraron y congelaron a -70°C hasta el momento de ser ensayados.

Ensayo para probar la actividad de IL-2

La actividad de la IL-2 se midió mediante un ensayo de proliferación con una línea celular murina dependiente de IL-2 (CTLL-2). La actividad fue calculada por análisis estadístico usando como referencia una preparación recombinante

de IL-2 humana obtenida de Cetus Corp., Emeryville, CA (33).

Ensayo para probar la actividad de IL-4

La concentración de IL-4 se determinó por bioensayo, utilizando la línea celular HT-2 como fue descrito por Mosmann y cols (34). Se incubaron diluciones seriadas de los sobrenadantes de los cultivos celulares con 5×10^3 células HT-2 por pozo, en un volumen final de 100 µL (microplacas de cultivo Falcon 3072) durante 24 horas. Durante las últimas 8 horas del cultivo, fueron marcadas con timidina tritiada, cosechadas y transferidas a papel para contarse en un contador beta. Los resultados se expresaron en unidades, de acuerdo a su comparación con curvas estándar obtenidas del cultivo en presencia de IL-4 recombinante (rIL-4, Genzyme, Boston, MA). Una unidad de cada interleuquina se definió como la cantidad necesaria para hacer proliferar al 50% de las células HT-2. La monoespecificidad del bioensayo se logró neutralizando las actividades de IL-2 e IL-4 con Acm anti-IL-2 (S4B6, Genzyme, Boston, MA) y Acm anti-IL-4 (11B11, Genzyme, Boston, MA).

Ensayo para probar la actividad de IL-1

Se realizó mediante un ensayo enzimático específico para IL-1 alfa (ELISA) obtenido comercialmente de la casa Endogen, Boston MA

Expresión de receptores para IL-2

Las células T (1×10^7 /ml) fueron activadas durante 3-6 días con 2 µg/ml de PHA. Las células activadas se dividieron en dos alcuotas: en la primera, se incubaron 1×10^5 células en un volumen total de 200 µl en placas de microcultivo con diluciones seriadas de IL-2 recombinante (Genzyme Corp., Boston Mass.). Las respuestas proliferativas después de 36 hrs de cultivo se midieron por incorporación de timidina tritiada

(3HTdr) como ya fue descrito (6,30). La segunda alícuota fue utilizada para experimentos por citometría de flujo: un millón de células fueron incubadas con 100 μ l de una dilución 1/100 de anticuerpo monoclonal anti-CD25 (donado por el Dr. T. Waldmann, NIH, USA), por 30 min a 4°C. Las células fueron lavadas tres veces con MC frío; la fracción F(ab')₂ del anticuerpo anti Ig G de ratón, conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Chemicals, St Louis, Mo, USA) se utilizó como anticuerpo revelador durante 30 min a 4°C. Las células se analizaron en un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson) equipado con una fuente de luz argón laser y el paquete de análisis consort 30; se contaron 10 000 eventos en cada muestra celular.

Tratamiento con pronasa

El ensayo fue realizado esencialmente como lo describieron Robb y Rusk (35) y como lo publicamos posteriormente (30). Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado una equivalencia de estas células post-tratamiento con pronasa y los receptores de alta afinidad para IL-2, por lo que a partir de este momento las consideramos como tales.

Absorción de IL-2

La capacidad de las células T, previamente activadas con mitógeno, para absorber una fuente exógena de IL-2 recombinante se realizó de acuerdo al método previamente descrito (30). En breve, 2×10^7 células se incubaron durante 5 hrs a 37 °C con 100 U de IL-2 recombinante. Al cabo de este tiempo, las células se centrifugaron y los sobrenadantes se ensayaron en su actividad residual de IL-2, expresándose el porcentaje de cambio.

Purificación de RNA

El RNA se purificó siguiendo el método de Chomczynski (36) y de acuerdo a los detalles recientemente publicados(37).

Transcriptasa Reversa

Los niveles de RNA para citocinas fueron estudiados por transcriptasa reversa en presencia de oligo [d(T)16] (GIBCO-BRL) como iniciador. El mRNA para la β -actina se utilizó como control interno. En todos los casos se tomaron 2 μ g de RNA total en 0.025ml de agua tratada con dietilpirocarbonato y se mezclaron con 0.3 μ g de oligo [d(T)16]. La mezcla se calentó a 70°C por 5 minutos, se enfrió y posteriormente se agregaron 50U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (GIBCO-BRL) y 0.5M de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato (GIBCO-BRL). La reacción de transcriptasa reversa se llevó a cabo mediante incubación por 60 minutos a 42°C seguida de 5 minutos a 95°C en un ciclador térmico (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, EUA).

Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación del cDNA obtenido mediante transcriptasa reversa por la reacción en cadena de la polimerasa, se mezclaron 10 μ l de cDNA con 0.5 μ g de oligonucleótidos sentido y antisentido para las distintas citocinas, 0.5M de deoxinucleótidos trifosfato y 2U de Taq DNA polimerasa (Perkin-Elmer). La amplificación se llevó a cabo mediante un ciclo a 94°C por 5 minutos, 55°C por minuto y 72°C por un minuto, seguido de 28 ciclos a 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por 5 minutos, todo esto en el ciclador térmico programado. Los productos amplificados se corrieron en electroforesis en un gel de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio. Los geles fueron fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta con película Polaroid 667.

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizó el paquete de computación de SAS (SAS Institute, Cary NC). El análisis de los datos y su manejo se realizó mediante los procedimientos NPARIWAY y FREQ de este sistema (1988). Las pruebas de t para 2 muestras y la U de Mann-Whitney fueron utilizadas para comparar los diferentes grupos. Valores de p menores a 0.05 se tomaron como significativos.

RESULTADOS

Estudio Longitudinal

Veinticinco de los 30 pacientes fueron seguidos durante 24 meses; 3 dejaron de asistir al

hospital por cambio de domicilio a los 6 meses y los otros 2 al año de iniciado el estudio.

En la tabla 1 se presentan las 7 mediciones

Tabla 1. Mediciones basales de los pacientes con lupus inactivo (1-12) y activo (13-30) y el promedio del grupo control.

Pac.	IL-2		R.IL-2 %		ABS	PROD. IL-1	
	PROD (U/mL)	RESP	CD25	pPRON	%	BASAL (pg/mL)	LPS
1	64	18415	28	5	32	120	610
2	18	14689	38	10	28	50	270
3	50	20462	40	8	38	40	650
4	88	20619	41	7	36	170	490
5	86	21416	40	6	50	120	670
6	52	18041	26	9	32	60	240
7	76	12415	34	6	41	60	690
8	53	15318	19	3	26	100	600
9	74	19615	28	4	31	60	315
10	39	16230	34	6	24	80	690
11	60	16420	42	10	30	40	750
12	103	15438	52	8	39	70	640
13	33	14671	42	7	26	400	830
14	42	4809	10	0	14	350	770
15	19	5816	14	1	18	375	650
16	36	10418	21	1	10	310	735
17	48	16001	28	1	18	265	730
18	30	9415	24	0	20	240	790
19	28	11040	32	2	22	180	675
20	18	5361	19	1	11	300	690
21	38	6218	16	2	10	280	520
22	44	14980	32	3	24	140	900
23	28	16004	32	2	24	350	890
24	14	8231	16	2	10	450	880
25	18	8260	30	2	12	360	550
26	18	14659	38	10	28	360	480
27	25	8387	24	0	14	180	650
28	32	11460	18	2	16	300	840
29	28	9410	16	1	10	280	670
30	36	10245	20	2	18	320	780
TESTIGOS (n=12)							
MEDIA	82	17880	48	9	49	89	1065
2 D.E.	3	5904	15	3	15	44	630

basales para cada uno de los pacientes y el promedio y desviación estándar del grupo control. Tomando como base de comparación el intervalo de confianza del 95% del grupo testigo, para cada una de las mediciones estudiadas, se encontró que todos los pacientes, a excepción de 1 (el no. 4, inactivo) tuvieron al menos una prueba por debajo del límite inferior de dicho intervalo. El promedio de mediciones anormales fue mayor en el grupo de pacientes con LEG activo (6.4 ± 0.9) que en el de pacientes con LEG inactivo (3.5 ± 1.1).

De las siete mediciones estudiadas, cinco (la deficiente producción de IL-2, la expresión disminuída de receptores de alta afinidad, la pobre capacidad de absorción de IL-2, la mayor producción basal de IL-1 y la baja producción ante el estímulo con LPS) correlacionaron significativamente con la actividad de la enfermedad (todas con $p < 0.01$). (Figura 3)

La evolución clínica de los pacientes fue hacia la mejoría. Como puede verse en la figura 4, los pacientes con lupus activo mostraron una disminución progresiva del número de mediciones inmunológicas anormales, hasta llegar en promedio a 1.6 ± 1.0 al término del estudio. En los pacientes con lupus inactivo también disminuyó el número de estas mediciones anormales, aunque ocasionalmente se observaron oscilaciones entre 2 y 3 mediciones alteradas.

En la figura 5 se presenta la evolución que tuvieron las diferentes pruebas inmunológicas a lo largo del estudio. Se muestra el número de pacientes de cada grupo que estuvieron por fuera del límite de confianza del 95% del grupo normal.

Normalización de las mediciones

Se consideró que una medición se había normalizado cuando no mostraba una diferencia significativa con los valores del grupo control, para lo cual se utilizó el intervalo de confianza del 95% ó el valor de t.

En los pacientes con lupus activo la pobre respuesta proliferativa de las células T y la producción deficiente de IL-1 inducida por LPS se corrigieron al cabo de 6 meses de tratamiento; al año lo hizo la producción espontánea de IL-1, mientras que la expresión de receptores de IL-2 de alta afinidad (i.e. post tratamiento con pronasa) lo hizo a los 18 meses y la deficiente producción de IL-2 a los 2 años. La pobre capacidad de absorber IL-2 por las células T de los pacientes persistió aún después de 2 años, pese a remisión clínica (Figs 5). La tendencia a la recuperación de estos parámetros fue más lenta en los pacientes con lupus activo, al compararse con lo observado en los pacientes en que al inicio del estudio estaban en remisión.

Efecto del tratamiento

En nueve pacientes se pudo evaluar el efecto de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) sobre el comportamiento de las mediciones inmunológicas. Se encontró un aumento significativo en la producción de IL-2 y en la respuesta proliferativa a IL-2 al cabo de 3 meses de estarlos tomando.

En la tabla 2 se aprecia que tanto dosis bajas como dosis altas de prednisona mejoraron la absorción de IL-2 in vitro. El mayor incremento en la producción de IL-2 y de IL-1 ante el estímulo con LPS lo observamos con dosis intermedias (20-45 mgs). Con dosis mayores de PDN se observó una disminución en la producción espontánea de IL-1, aumento en la capacidad de absorber IL-2 y reducción importante de la producción espontánea de IL-1.

En 9 de 14 pacientes que recibieron pulsos intravenosos de ciclofosfamida, se observó mejoría en 6 de los 7 parámetros evaluados.

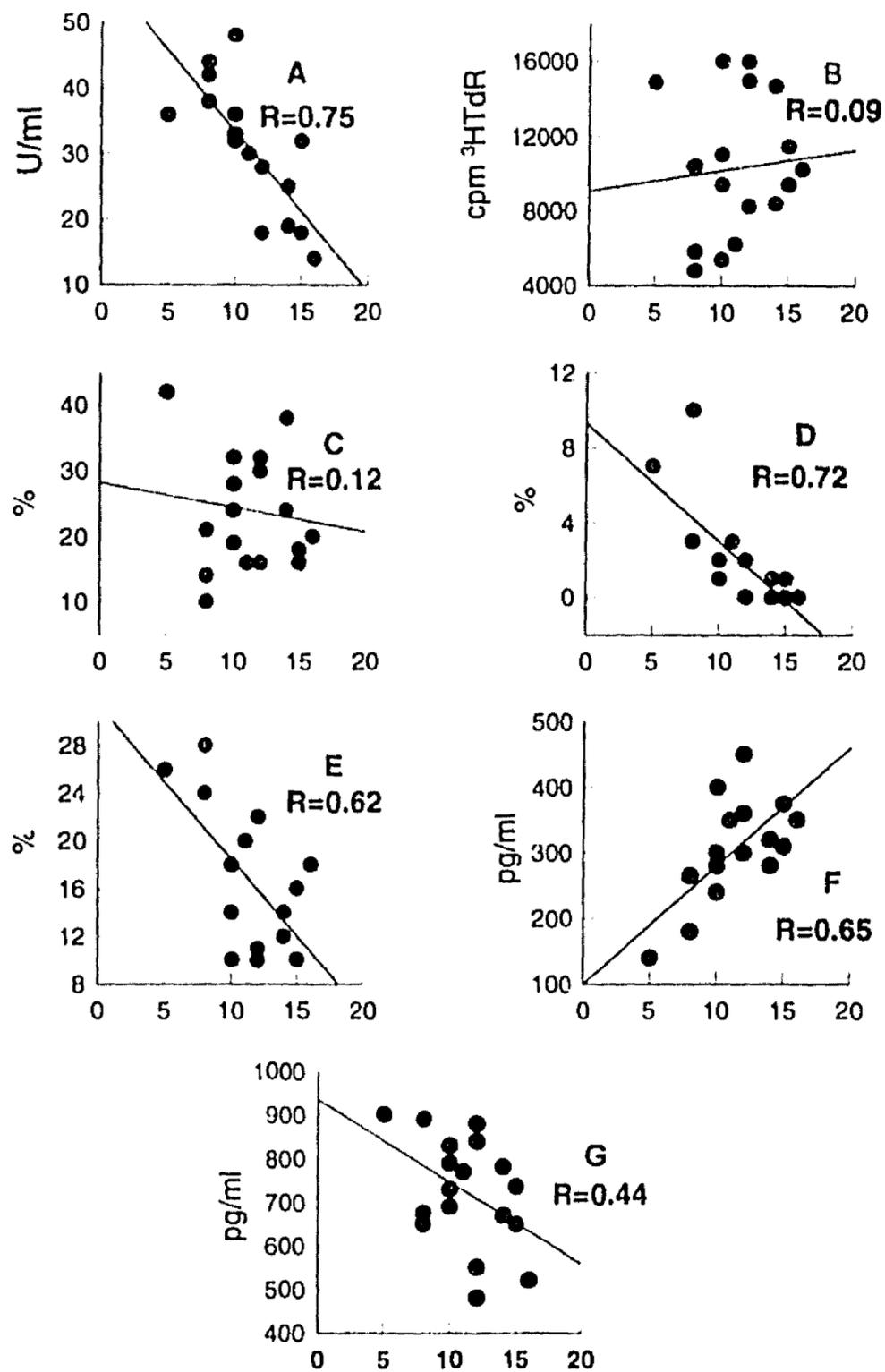


Figura 3. Correlación entre la actividad clínica: eje de las x, MEX-SLEDAI y los resultados de cada una de las determinaciones. A) Producción de IL-2, B) Respuesta Proliferativa, C) Receptores de IL-2 (Baja Afinidad), D) Receptores de IL-2 (Alta Afinidad), E) Absorción de IL-2, F) Producción Espontánea de IL-1, G) Producción de IL-1 (LPS).

Efecto de CD28 sobre la producción de IL-2

En la figura 6 se observa que la producción de IL-2 por los linfocitos de pacientes con LEG bajo el estímulo *in vitro* con anticuerpo anti-CD3, fue menor que la obtenida de los linfocitos de sujetos sanos. En los pacientes con la enfermedad activa esta deficiencia fue más pronunciada.

Figura 4. Promedio de mediciones anormales ± E.E., que tuvieron los pacientes en los diferentes tiempos, expresados en meses (eje de las x)

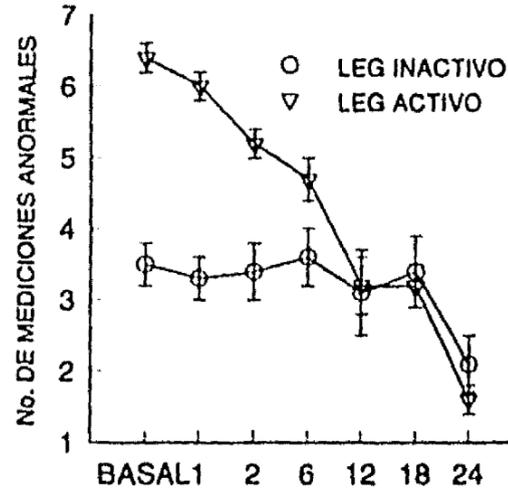


Tabla 2. Efecto de los diferentes medicamentos sobre las mediciones inmunológicas.

	IL-2		%CD25	%ALTA	AF. ABSORC.	PRODUC. IL-1	
	PROD	RESP				BASAL	I.P.S
AINES							
No. Pac.	5/9	6/9	6/9	4/9	9/9	6/9	5/9
$\bar{x} \pm E.E.$	25±12	7±3	5±1	4±2	8±2	61±20	180±56
Prednisona (0-20 mg)							
No. Pac.	6/13	7/13	8/13	6/13	7/13	7/13	5/13
$\bar{x} \pm E.E.$	11±3	3±1	5±4	2±0.4	9±1	69±20	152±37
Prednisona (20-50 mg)							
No. Pac.	10/13	5/13	10/13	9/13	9/13	9/13	7/13
$\bar{x} \pm E.E.$	13±2	8±2	8±1	4±0.7	8±2	71±22	379±103
Prednisona (>50 mg)							
No. Pac.	8/11	6/11	7/11	8/11	5/11	3/11	10/11
$\bar{x} \pm E.E.$	13±3	4±1	9±2	2±0.7	8±1	167±34	288±51
D. Citotóxicas (0-50 mg)							
No. Pac.	9/11	6/11	10/11	8/11	8/11	7/11	8/11
$\bar{x} \pm E.E.$	10±2	3±1	2±1	3±0.7	10±2	91±44	249±56
D. Citotóxicas (>50 mg)							
No. Pac.	23/28	17/28	18/28	18/28	20/28	13/28	16/28
$\bar{x} \pm E.E.$	18±3	4±0.8	6±1	3±0.5	8±1	76±22	364±58
Ciclofosfamida I.V.							
No. Pac.	6/14	7/14	8/14	6/14	7/14	7/14	5/14
$\bar{x} \pm E.E.$	14±4	5±1	10±2	3±0.7	8±2	64±15	342±93

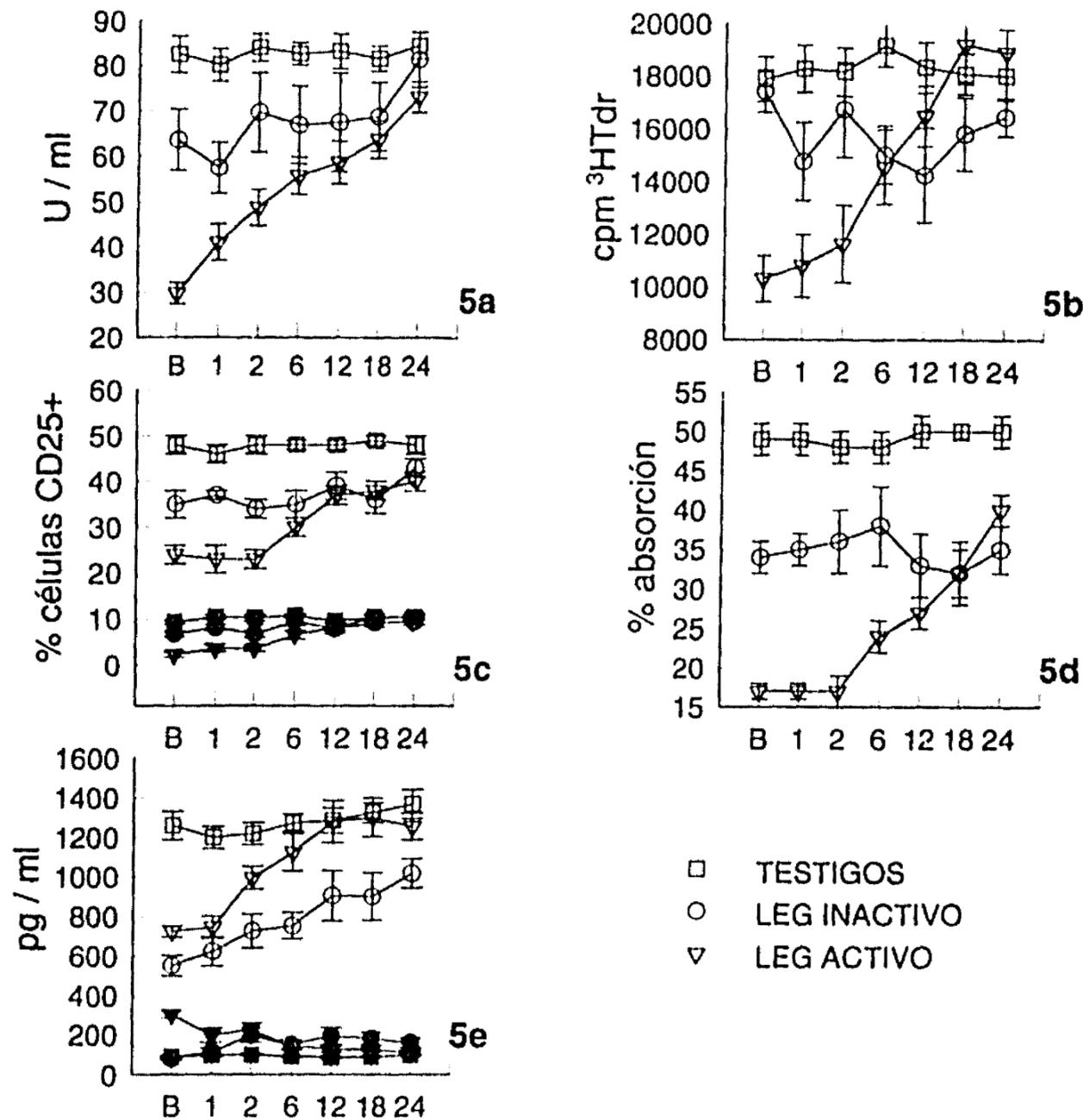


Figura 5. Evolución a largo plazo del estudio (eje de las x = meses) de las diferentes pruebas inmunológicas: a) producción de IL-2; b) respuesta proliferativa; c) expresión de CD25, de alta afinidad (símbolos llenos) y de baja afinidad; d) capacidad para absorber IL-2; e) producción de IL-1, espontánea (símbolos llenos) y con LPS.

Se observó un incremento en la secreción de IL-2 en todos los casos al coestimular con el Ac anti-CD28. En la misma figura se aprecia que el incremento en la secreción de IL-2 al cultivar las células en presencia de anti-CD28, fue mayor en las células de pacientes con lupus activo. En

promedio, hubo aumento significativo ($p < 0.01$) en la producción de IL-2 al comparar los niveles de producción con anti CD3 y aquellos obtenidos con la adición de anti CD28. Los linfocitos de pacientes con enfermedad activa presentaron un incremento del 81% en la producción de IL-2

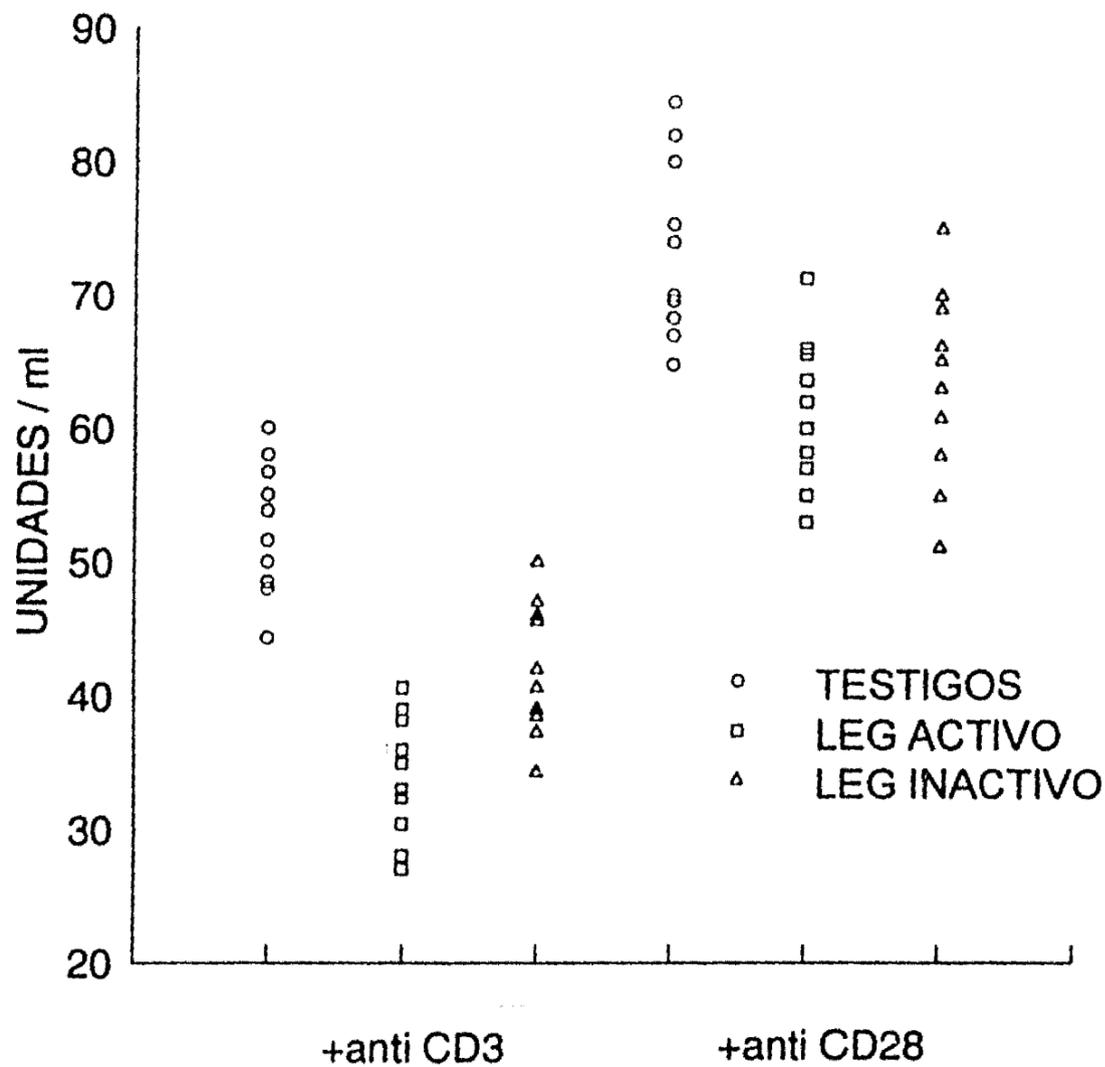


Figura 6. Efecto de anti-CD28 sobre la producción de IL-2

al cultivarse con anti-CD28, 48 % en los pacientes con lupus inactivo y 40 % en las células de individuos normales.

Subpoblaciones de células T

Los porcentajes y las cifras absolutas de las subpoblaciones CD4+, CD8+, CD45RO+ y CD45RO- de las células T de los pacientes con lupus y de los controles, pueden observarse en la figura 7.

Las cifras porcentuales fueron semejantes entre ambos grupos, sin embargo, al considerarse los números absolutos, hubo una disminución significativa ($p < 0.01$ en todos los casos) en las

células CD4+, CD45RO+ y CD45RO- de los pacientes con LEG, al compararse con los testigos. Al dividirlos de acuerdo a su actividad clínica, los pacientes con enfermedad activa tuvieron las cifras más bajas.

Producción de IL-2 por las subpoblaciones de células T

En la figura 8 se observan los niveles de IL-2 (U/mL) obtenidos en los sobrenadantes de dichos cultivos, mientras que en la figura 9 se presentan las mediciones de IL-4 obtenidas en las mismas muestras.

En condiciones basales (i.e. sin estímulo) no se observó producción de IL-2 en ninguno de los sobrenadantes. En los pacientes con LEG, la producción de IL-2 en células T estimuladas por PHA ó por anti-CD3 fue significativamente menor a la observada en las células T de los testigos (32.4 ± 7.9 U/mL en las CD45RO+ del grupo total de LEG estimuladas con PHA y 37.1 ± 8.9 U/mL en las estimuladas con anti-CD3 contra 62.7 ± 4.2 U/mL y 65.3 ± 7.0 U/mL en las CD45RO+ de controles estimuladas con PHA y anti-CD3 respectivamente ($p < 0.01$ en ambas condiciones). Esta diferencia fue más marcada en los pacientes con lupus activo que en los pacientes con lupus inactivo, como se aprecia en la figura 8.

Al igual que las células T CD45RO+, las células CD45RO- estimuladas de los pacientes produjeron menos IL-2 que las células T de los testigos y la disminución también correlacionó con la actividad clínica de los pacientes.

Producción de IL-4 por las subpoblaciones de células T

Las células T CD45RO+ del grupo total de pacientes con LEG produjeron de manera espontánea significativamente más IL-4 que las células CD45RO+ de los testigos (6.7 ± 3.1 U/mL, vs 0.53 ± 0.4 U/mL, $p < 0.001$). Esta diferencia fue a expensas de las células T CD45RO+ de los pacientes activos, ya que éstos produjeron significativamente más IL-4 que las células T CD45RO+ de los pacientes inactivos (9.1 ± 3.0 U/mL contra 4.5 ± 0.9 U/mL, $p < 0.01$).

Las células T CD45RO+ estimuladas con PHA, de los pacientes con lupus activo, produjeron significativamente menos IL-4 que las de los pacientes inactivos y que los testigos (22.5 ± 7 U/mL, 38.1 ± 7.5 U/mL y 38.5 ± 6.7 U/mL respectivamente, $p < 0.05$). Las células T CD45RO+ estimuladas con anti-CD3 de los pacientes activos se comportaron de manera similar a las esti-

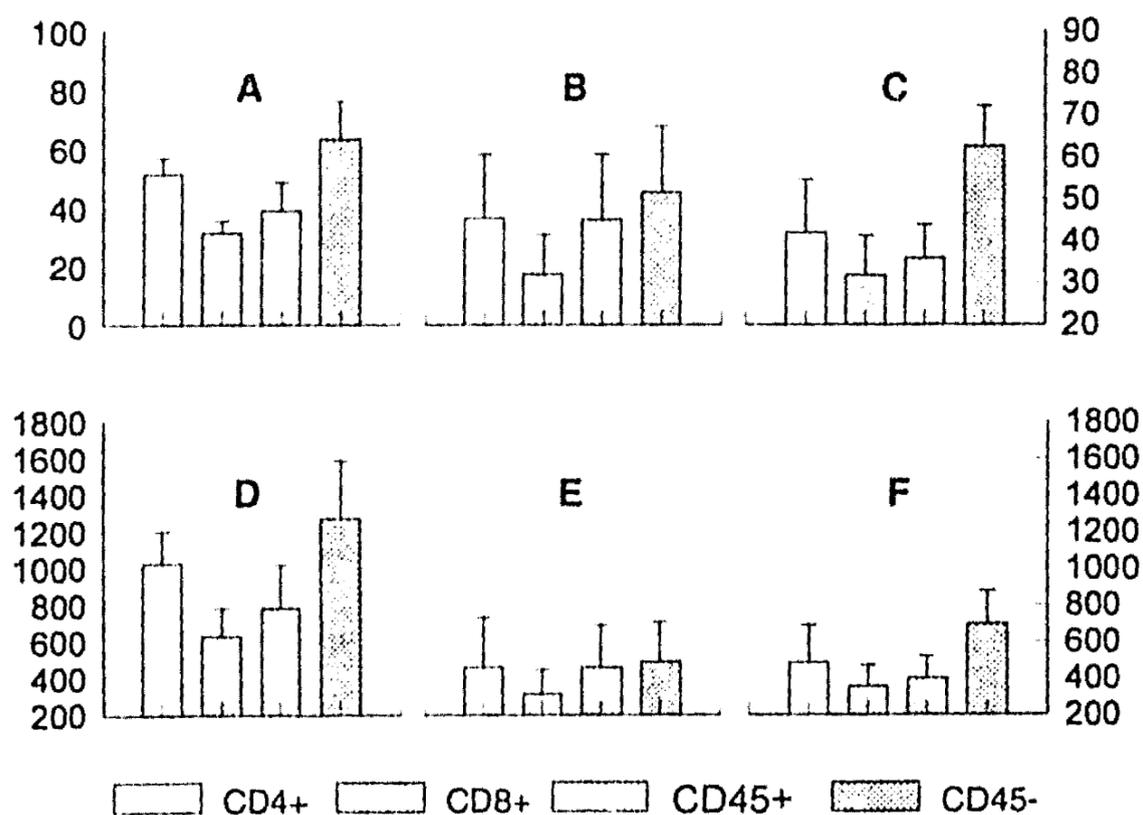


Figura 7. Porcentajes y cifras absolutas de las subpoblaciones T de normales (A y D), pacientes con LEG activo (B y E) y LEG inactivo (C y F)

muladas con PHA (29.1 ± 5.2 U/ml. contra 37.7 ± 6 U/ml de los pacientes inactivos y 40.5 ± 2 U/ml de los testigos, $p < 0.05$). No hubo diferencia entre la producción de IL-4 por las células T CD45RO+ estimuladas con PHA o con anti-CD3 de pacientes inactivos y de testigos (Figura 9).

La producción de IL-4 por las células T CD45RO- fue similar entre las células del grupo total de pacientes con LEG y las células de los testigos. No hubo diferencias en la actividad de IL-4 encontrada en los sobrenadantes de las células de los tres grupos estudiados, tanto en con-

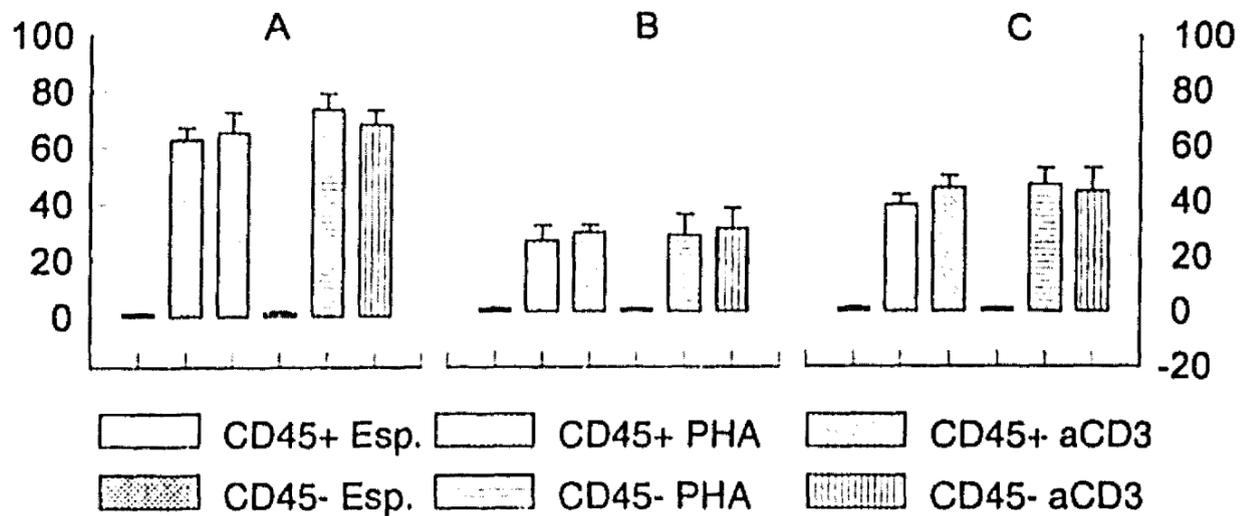


Figura 8. Producción de IL-2 (U/ml) por las subpoblaciones T de controles (A), LEG activo (B) y LEG inactivo (C).

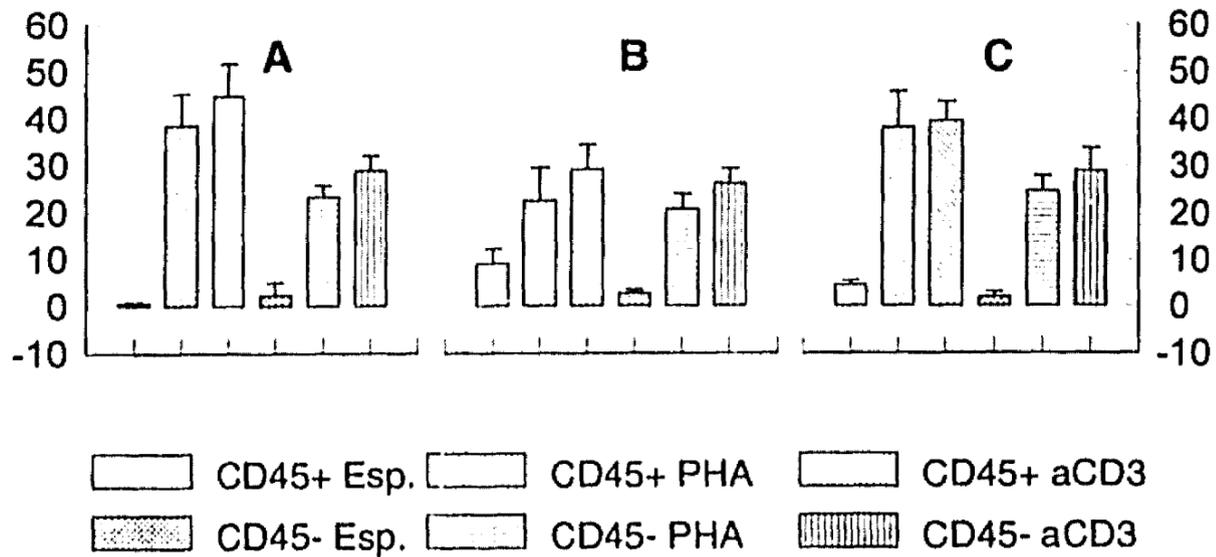


Figura 9. Producción de IL-4 (U/ml) por las subpoblaciones T de controles (A), LEG activo (B) y LEG inactivo (C).

diciones basales (2.2 ± 2.8 U/mL en testigos, 2.5 ± 1 U/mL en lupus inactivo y 2.7 ± 0.7 U/mL en lupus activo) como cuando se estimularon con PHA (23.3 ± 2.3 U/mL en testigos, 24.5 ± 3.3 U/mL en lupus inactivo y 20.6 ± 3.2 U/mL en lupus activo) y cuando se cultivaron con anti-CD3 (28.9 ± 3.2 U/mL en testigos, 28.9 ± 4.9 U/mL en lupus inactivo y 26.1 ± 3.2 U/mL en lupus activo) (Figura 9).

Diferencias en la producción de IL-2 e IL-4 entre las células T CD45RO+ y CD45RO-

Las células T CD45RO- de los individuos sanos produjeron más IL-2 que las CD45RO+ al estimarse in vitro, aunque la diferencia entre las dos subpoblaciones solo fue significativa ante el estímulo con PHA (73.6 ± 5.5 U/mL en CD45RO- contra 62.7 ± 4.2 U/mL en CD45RO+, $p < 0.001$). La producción de IL-2 fue similar entre ambas subpoblaciones de células T (CD45RO+ y CD45RO-) en los pacientes con lupus, activos e inactivos.

Por otra parte, las células T CD45RO- de individuos normales al cultivarse en condiciones basales, sin estímulo (i.e. sin estímulo) tuvieron una pequeña pero significativa ($p < 0.05$) producción de IL-4 al compararse con las células T CD45RO+ (2.25 ± 2.7 U/mL contra 0.53 ± 0.43 U/mL respectivamente. Sin embargo, al estimularse, tanto con PHA como con anti-CD3, las células T CD45RO+ produjeron significativamente más IL-4 que las CD45RO- (38.5 ± 6.7 U/mL en CD45RO+ vs 23.3 ± 2.3 U/mL en CD45RO- en las células estimuladas con PHA y 44.8 ± 6.8 U/mL en CD45RO+ vs 28.9 ± 3.1 U/mL en CD45RO- cuando se estimularon con anti-CD3, $p < 0.01$ en ambos casos).

En los pacientes con lupus inactivo las células T CD45RO+ produjeron significativamente más IL-4 que las CD45RO-, tanto espontáneamente (4.5 ± 0.9 U/mL contra 1.9 ± 1.1 U/mL), $p < 0.01$, como cuando fueron estimuladas con PHA (38.1 ± 7.5 U/mL contra 24.5 ± 3.3 U/mL),

$p < 0.05$. Bajo el estímulo con anti-CD3, aunque la producción de IL-4 fue mayor en las células T CD45RO+, la diferencia no resultó significativa.

En los pacientes con lupus activo se observó que la producción espontánea de IL-4 fue a expensas principalmente de las células T CD45RO+ (9.1 ± 3 U/mL), comparado con las células T CD45RO- (2.7 ± 0.7 U/mL), $p < 0.01$). Al cultivar con mitógenos, la producción de IL-4 fue similar en ambas subpoblaciones.

Expresión de mRNA de IL-2 e IL-4 en CMN de pacientes con LEG

Todos los RNA de las células de los individuos estudiados en estos experimentos mostraron estar libres de DNA y proteínas contaminantes (datos no mostrados). Como control interno de transcripción empleamos la β -actina que es un gen cuya expresión no varía a través del ciclo celular y que lo hace en forma constitutiva. Asimismo, la reacción de transcriptasa reversa se llevó a cabo siempre con 2mg de RNA total.

El mRNA para IL-1 β , IL-2 e IL-4 fue identificado en CMN de 10 pacientes con LEG y en 10 individuos sanos (Tabla 3).

Tabla 3. Expresión de genes de citocinas en células mononucleares de pacientes con lupus y de sujetos sanos (n=10).

	IL-1 β	IL-2	IL-4
LEG			
+	2	0	7
-	8	10	3
TESTIGOS			
+	1	0	0
-	9	10	10

Determinado por la reacción de transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa. Se considero positivo a aquel producto amplificado que por densitometría tuvo un valor mayor al obtenido con el gen de la β actina.

En 2 de los pacientes con lupus y en un individuo sano se encontró la expresión de IL-1 β , mientras que en ninguna muestra se encontró la expresión in vivo de los genes para IL-2. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con lupus (7 de 10) hubo expresión genética de IL-4.

Al extender estos estudios a las subpoblaciones CD45RO, se encontró expresión del gene de IL-4 en las células CD45RO+ de 4 de 5 pacientes con lupus activo, no así en las CD45RO- de los mismos pacientes (Tabla 4).

Tabla 4. Expresión de genes de citocinas en subpoblaciones T CD45RO de pacientes con lupus eritematoso generalizado

	IL-2	IL-4	IL-6	TNF	IL-10
CD45RO+	±	++	+	+	+++
CD45RO-	±	+	++	+	+

Experimentos realizados en 5 pacientes con lupus activo
Se consideró positivo a aquel producto amplificado que por densitometría tuvo un valor mayor al obtenido con el gen de la β actina.

DISCUSION

Los resultados de este trabajo indican que la evaluación integral de IL-2 requiere de la medición simultánea de diferentes parámetros tanto en la producción como en la respuesta a IL-2. En el grupo total de pacientes estudiados sin considerar su estado de actividad clínica, encontramos una afección más profunda en los parámetros que miden la respuesta a IL-2 que en la producción de esta citocina. La alteración cuantitativa y cualitativa es mayor en los pacientes con lupus activo, comparada con la de aquellos que se encuentran en remisión. Individualmente, la expresión de receptores de alta afinidad para IL-2 y la capacidad de absorber este factor, fueron las mediciones que mostraron mayor alteración.

En diferentes trabajos se ha discutido la relación de estas deficiencias con la actividad clínica del lupus así como con diferentes tratamientos médicos (7-12). Sin embargo, es difícil obtener conclusiones debido a que la mayoría de ellos mezclan pacientes inactivos y activos y con diferentes esquemas de tratamiento. En este trabajo, los pacientes no recibían ningún medicamento cuando se inició el estudio. En estas condiciones, aquellos con lupus activo tuvieron un mayor número de mediciones anormales que los pacientes inactivos.

La corrección de diferentes parámetros ocurrió en distintos tiempos: la pobre respuesta proliferativa de las células T y la producción deficiente de IL-1 inducida por LPS se corrigieron al cabo de seis meses de tratamiento; al año lo hizo la producción espontánea de IL-1, mientras que la expresión de receptores de IL-2 de alta afinidad lo hizo a los 18 meses y la deficiente producción de IL-2 hasta los 2 años. La pobre capacidad de absorber IL-2 por las células T de los pacientes persistió aún después de 2 años de tratamiento. Esto sugiere que la producción de IL-1 en sus dos modalidades tiene mecanismos diferentes, uno más lábil al efecto de los esteroides y otro, el generado tal vez *in vivo*, en

las células de los pacientes con lupus (y otras enfermedades autoinmunes) que responde más lentamente al tratamiento con AINES y/o corticosteroides. No conocemos el significado de estos hallazgos, pero sugieren que en la producción de IL-1 participan diversos factores reguladores de la respuesta inmune.

En la respuesta a IL-2 participan numerosas variables y posiblemente las diferentes mediciones que realizamos en nuestro laboratorio permitan identificar diferentes grados de afección de la célula T o de otras señales aún no conocidas. Se sabe que la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (p55.Tac) no se acompaña de cambios funcionales importantes en las células T (38). Sólo cuando se expresa la cadena beta y en su interacción con la p55, se acopla e internaliza la IL-2 y se suceden las subsecuentes señales intracelulares (39). Así, la sola medición del porcentaje de células T que se unen al Ag CD25 no es de gran ayuda, debido a la gran heterogeneidad de su expresión. En nuestra experiencia, los receptores que resisten al tratamiento con pronasa son en su mayoría los de alta afinidad y, sumada a la capacidad de absorber IL-2 exógena, nos dan una mejor apreciación de la respuesta a IL-2 que los ensayos de proliferación.

La recuperación de estas variables no fue igual: a los 6 meses de tratamiento se normalizó la respuesta proliferativa a IL-2; a mediano plazo lo hizo la expresión de receptores de alta afinidad, y la absorción normal de IL-2 prácticamente no se logró aún al cabo de 2 años, apoyando la noción de que esta capacidad depende de varios factores y que en el LEG parecen afectarse en forma profunda.

La producción de IL-2 *per se* es una señal para la expresión de receptores de IL-2, por lo que su deficiencia en las células T de pacientes con LEG sería otro factor del que depende la po-

entre estos 2 fenómenos no se conoce con precisión. De igual manera, la IL-1 se considera un requisito importante para la activación de las células T, y es posible que la dicotomía observada en su producción por las células de pacientes con LEG refleje la deficiencia de otros mecanismos celulares en estos pacientes, con capacidad de regulación sobre las células T o bien un defecto celular no dependiente de IL-1 (40).

La administración aguda y de dosis altas de corticoesteroides tanto en ratones, como en humanos, modifica la actividad de la IL-2 (41-42). Sin embargo, en pacientes con lupus no se conocen los efectos a dosis terapéuticas de los AINES y de los corticoesteroides. En nuestro estudio, a lo largo de dos años, encontramos que ambos medicamentos modifican la producción y la respuesta a IL-2. En el caso de los AINES, de los cuales con mayor frecuencia se utilizó la indometacina, se vió una mejora significativa, aunque no su normalización, en la producción de IL-2, y en la respuesta proliferativa de las células T al cultivarlas con IL-2 exógena.

La acción de los glucocorticoides sobre las funciones inmunes es generalmente inmunosupresora. Se ha señalado que inhiben la producción y la respuesta de citocinas y recientemente se ha demostrado que inhiben la expresión genética del RIL-2 y que induce receptores de alta afinidad para IL-1 en linfocitos humanos (41-42). Sin embargo, estos experimentos se han llevado a cabo *in vitro* y, de acuerdo a Rocha y colaboradores (43) son diferentes sus implicaciones *in vivo*, donde la información es escasa.

El hecho de que la prednisona tenga una acción dosis-efecto de mejora sobre los parámetros que miden la respuesta a IL-2 y que a dosis altas se haya observado aumento en la capacidad de absorber IL-2 así como reducción importante de la producción espontánea de IL-1, sugiere que diferentes células son blanco de su acción. Estudios a mayor plazo y en una muestra mayor de pacientes ayudarán a entender mejor estos mecanismos.

También mostramos que la molécula CD28 participa en los mecanismos de activación linfocitaria que conducen a la proliferación de linfocitos T y a la producción de IL-2 por estas mismas células, en un sistema de estimulación *in vitro* con anti-CD3. Encontramos además, que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso generalizado al cultivarse en presencia de este anticuerpo tienen una respuesta diferente a la observada en células normales. Los linfocitos T de pacientes con LEG respondieron en forma dependiente de su estado de actividad clínica, ya que presentaron una hiper-respuesta en los ensayos de proliferación y liberación de IL-2 cuando además de anti-CD3 se agregó anti-CD28. La posibilidad de que estas alteraciones fueran debidas a un cambio numérico en la expresión de CD28 en la superficie celular, pudiera explicarse en algunos pacientes, principalmente aquellos con enfermedad activa que en forma significativa tuvieron un menor porcentaje de células CD8 positivas para este antígeno de diferenciación.

En diferentes trabajos se ha demostrado que este heterodímero regula la activación de linfocitos T, solo o en interacción con su ligando natural B7 expresado en diferentes células presentadoras de antígeno. Las señales que provee CD28 se han llamado "secundarias" puesto que en conjunto con otras vías de activación llevan al aumento en la producción de citocinas y de la respuesta proliferativa. La señal coestimuladora transmitida por CD28 se observa en células previamente activadas mediante otras moléculas, tales como RCT/CD3, CD2, o CD5, aunque no se descarta que también participen moléculas como ICAM-1, ya que rápidamente aumenta la adhesión celular T mediada por integrinas (44-45).

La noción de que CD28 regula la respuesta inmune, pero no la inicia es congruente con el hecho de que su participación se observa en células previamente activadas. Podría pensarse que su expresión disminuida en linfocitos en pacientes con LEG desregula la respuesta linfocitaria, lo cual contribuiría a la hiperrespuesta prolifera-

rativa y a la producción de IL-2 que se observó en este trabajo al coestimular con anti-CD28.

Schwartz y colaboradores (46) han propuesto que la presentación antigénica en ausencia de coestimulación de las células T conduce a la inactivación funcional o anergia clonal de células T y/o a la muerte celular. Esta teoría propone que los diversos caminos de estimulación T determinen el que una célula permanezca activa, se inactive o llegue a un estado de anergia. Aunque no se conocen las bases moleculares de esta coestimulación, se ha puesto gran atención sobre el papel de CD28 en el desarrollo de anergia clonal, debido a su papel central en la regulación de producción de citocinas. La coestimulación con CD28 es parcialmente resistente a ciclosporina. En un trabajo previo (47) clonamos una subpoblación de linfocitos T de pacientes con lupus, resistentes a ciclosporina, productora de IL-3 y que en estudios recientes (datos no mostrados en este trabajo) encontramos que es CD28+. Estas células estimulan la proliferación y la producción de IL-2 en células T normales y de pacientes con lupus, efecto que es igualmente resistente a ciclosporina.

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

En el último grupo de experimentos, se encontraron diferencias en la distribución de las subpoblaciones de células T de pacientes con LEG y en su capacidad para producir IL-2 e IL-4 al compararlas con lo obtenido de células T de sujetos sanos.

En el grupo de pacientes con lupus se encontró disminución en el número absoluto de cé-

lulas T CD4+, CD45RO+ y CD45RO-, disminución en la producción de IL-2 tanto por las células T CD45RO+ como por las CD45RO-, producción espontánea de IL-4 y disminución en su producción bajo estímulo por las células CD45RO+. Estos hallazgos guardaron relación con la actividad de la enfermedad.

Las alteraciones en los números tanto relativos como absolutos de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ en el lupus han sido señaladas en varios trabajos previos. En pacientes con compromiso renal se ha descrito una disminución en el número de células T CD4+ circulantes, en relación directa con la presencia de anticuerpos anti-linfocitos, dirigidos en particular contra la subpoblación CD45RA+/RO- (2H4+), la cual presenta una supuesta actividad inductora de supresión sobre las células B, lo que de alguna manera explica la activación policlonal de estas células observada en el LEG (48). Estos resultados no concuerdan con las observaciones realizadas por Morimoto (26) y por Raziuddin (49), quienes encontraron un aumento en el número de células T CD4+ en los pacientes, que correlaciona con la actividad de la enfermedad, al compararlo con el número observado en individuos sanos o que padecen artritis reumatoide. Aunque aceptan la disminución en las células T CD45RO- (2H4+) debida a la presencia de auto-anticuerpos, estos autores también muestran un aumento importante de la subpoblación CD45RO+ (4B4, CD29+), la que induce ayuda para la producción de anticuerpos. Estos cambios podrían tener un significado patogénico: la disminución en la subpoblación CD45RA+/RO- durante las exacerbaciones de la enfermedad, puede ser consecuencia de la activación de las células "vírgenes" (RA+/RO-) y su diferenciación acelerada *in vivo* a células de "memoria" (RA-/RO+), las que pueden regular la producción de auto-anticuerpos por las células B.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, por Melendro y colaboradores (50) y por Bakke (51) en 1983, se encontró una disminución en el porcentaje de células T CD8+ en los

pacientes con LEG activo. Sin embargo, en el presente trabajo, el porcentaje de estas células fue semejante en pacientes y testigos. La explicación de ello podría radicar en diferencias técnicas, puesto que la medición con citofluorometría de flujo es más sensible que la lectura al microscopio de fluorescencia.

Los resultados de este estudio confirman una vez más numerosos informes sobre la producción disminuida de IL-2 por las células T de los pacientes con LEG, en estrecha relación con su estado de actividad clínica. No hubo diferencias entre las células T CD45RO⁺ y CD45RO⁻ en este defecto. La mayor producción de IL-2 por las células T CD45RO⁻ en los individuos sanos estudiados concuerda con lo publicado por Salmon en 1989 (52) y por Swain y colaboradores (53) en cuanto a que las células T CD45RA⁺/RO⁻ de donadores sanos producen más IL-2 que las CD45RA⁻/RO⁺. Es interesante observar que esta diferencia entre subpoblaciones desaparece en los pacientes con LEG.

Una explicación a esto podría ser que el antígeno de superficie CD45RA participe con mayor eficiencia en el estímulo para la producción de IL-2 que el CD45RO a través de señales intracelulares que resultan en la activación de proteína kinasa C, en conjunto con el receptor de las células T y la molécula CD3 (54, 55); en consecuencia, la disminución de la subpoblación de células T que posee esta molécula llevaría a la disminución en la producción de IL-2 por las células T de estos pacientes.

Las células T CD45RO⁺ de los pacientes con LEG produjeron espontáneamente IL-4, lo cual no se encontró en las células de los testigos. Esta producción espontánea, por primera vez encontrada, fue mayor en los pacientes activos. Por otra parte, una vez estimuladas *in vitro*, las células T de los pacientes con lupus activo produjeron menos IL-4 que las de los pacientes inactivos y que las de los testigos, mientras que la producción de IL-4 por las células T CD45RO⁻ fue similar en pacientes y en testigos. En individuos

sanos y en pacientes con LEG inactivo se observó mayor producción de IL-4 por las células T CD45RO⁻ después de estimularlas con PHA y anti-CD3. Estos resultados están de acuerdo con lo estudiado previamente en sujetos sanos por Salmon (52), quien encontró una mayor señal del RNA mensajero para IL-4 en las células T CD45RA⁻/RO⁺.

El papel de la IL-4 se ha estudiado en algunos modelos murinos del lupus. En ratones MRL/lpr se ha encontrado una disminución de la expresión del RNAm específico para esta molécula, mientras que en células de ganglios linfáticos de ratones C3H/lpr, se encontró mayor secreción de IL-4 al estimularlas *in vitro*. Handwerker (27) observó que los ratones Palmerston North, que desarrollan una enfermedad parecida a lupus, tienen en sus células de bazo una gran capacidad para producir IL-4 y que expresan RNAm de IL-4 después de su estimulación *in vitro*. Estos ratones tienen títulos altos de anticuerpos anti-DNA de isotipo IgG1, lo que es consistente con el posible papel de la IL-4 en la hiperactividad de las células B de estos ratones.

Esta citocina (IL-4) ha sido pobremente estudiada en el lupus humano. Kallenberg y colaboradores (28) reportaron que las células T de sangre periférica de pacientes con lupus o con enfermedad mixta de tejido conectivo, no son diferentes a las células T de controles en su capacidad para producir factores estimuladores de células B, incluyendo la IL-4. Tan y colaboradores en 1989 (29) reportaron que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con lupus no expresan espontáneamente RNAm de IL-2, IL-3 e IL-4. Datos preliminares de nuestro laboratorio, presentados en este trabajo, muestran la expresión espontánea del gen para IL-4 en las células CD45RO⁺ de 4 de 5 pacientes con lupus activo, no así en sus células CD45RO⁻.

Aunque la IL-2, IL-4, IL-10, γ -IFN y TGF- α son citocinas pleiotrópicas, producidas por células T CD4⁺, cada una tiene un papel diferente en la respuesta inmune. Estas citocinas

tienen varios efectos sobre el resto de las células linfoides que resultan en la inducción de un mecanismo particular de diferenciación y en la supresión de otros mecanismos. Un claro ejemplo de esto se observa en la inducción del cambio de isotipo en los linfocitos B por la IL-4. Existen datos que muestran el efecto regulador de ciertas citocinas en la diferenciación de distintas subpoblaciones de células T de ayuda.(56). Recientemente hemos encontrado que además de IL-4, los genes que codifican para IL-6, IL-10 y FNT α se expresan en mayor proporción en células de pacientes con lupus que en las de sujetos normales (57). Este grupo de citocinas posee un gran efecto sobre la proliferación y diferenciación de las células B, lo que podría explicar su hiperactividad y en consecuencia la producción de autoanticuerpos. Sin embargo, puesto que otras células no T también pueden producir estas citocinas, en nuestro laboratorio llevamos a cabo estudios con células B y macrófagos para dilucidar su posible participación en la producción espontánea de estas moléculas. Esto ha sido confirmado recientemente para el caso de la IL-10, que es producida principalmente por células "no T" en los pacientes con lupus. Tendríamos varias posibilidades en la regulación anormal de las células B de pacientes con lupus: la activación crónica y tal vez *in vivo* de una subpoblación T CD4+ del subgrupo Th2 llevaría a la síntesis de IL-4, IL-6 e IL-10, que en forma parácrina sobre el linfocito B le llevaría a su proliferación y producción de autoanticuerpos. Es posible también que la auto-reactividad del linfocito B de pacientes con lupus le provea de la capacidad de producir éstas y otras citocinas, el mismo con acción autócrina. La posibilidad de que los macrófagos contribuyan a la hiperactividad de las células B, a través de un camino T- independiente, la estamos investigando en nuestro laboratorio.

La producción espontánea de IL-4 por las células T CD45RO+ de pacientes con LEG podría tener efecto sobre la subpoblación CD45RA+, regulando negativamente su proliferación. Esto podría ser parte de una red de regu-

lación a través de citocinas, semejante a la descrita para Th1 y Th2 y recientemente comprobada, en el caso de IL-2, que induce la expresión de CD45RO y el fenotipo de memoria en las células CD45RA+ de sangre periférica (58).

Los resultados de este estudio son útiles, y aunque se requiere ampliar la muestra, y el número de citocinas probadas, reflejan que en el lupus eritematoso generalizado existen defectos profundos en las células T que incluyen la producción de citocinas y seguramente los mecanismos de transducción intracelular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México. (892257 y M9107-0157)

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Alarcón Segovia, D., Alcocer Varela, J., Diaz Jouanen, E., The connective tissue diseases as disorders of immune regulation. *Clin Rheum Dis.* 11:451-463, 1985.
 - 2 - Fauci, A.S., Steinberg, A.D., Haynes, B.F., Whalen, G., Immunoregulatory aberrations in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 121: 1473-1477, 1978.
 - 3 - Sakane, T., Steinberg, A.D., Reeves, J.P., Green, I., Studies of immune functions of patients with systemic lupus erythematosus: T-cell subsets and antibodies to T-cells subsets. *J. Clin Invest* 64: 12-60, 1979.
 - 4 - Laffón, A.; Alcocer-Varela, J. and Alarcón-Segovia, D., Differences in the kinetics of the autologous mixed lymphocyte reaction between the various connective tissue diseases. *Rheumatol Int* 3:117-128, 1983.
 - 5 - Ruiz- Arguelles, A., Alarcón-Segovia, D., Llorente, L., and Del Giudici-Knipping, J.A., Heterogeneity of the spontaneously expanded and mitogen-induced generation of suppressor cell function of T cells on B cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 23:1004-1008, 1980.
 - 6 - Alcocer-Varela J., and Alarcón-Segovia, D., Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 69:1388-1392, 1982.
 - 7 - Linker-Israeli, M., Bakke, A.C., Quismorio, F.P., Jr., and Horvitz, D.A., Correction of interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus by removal of spontaneously activated suppressor cells. *J Clin Invest.* 75:762-768, 1985.
 - 8 - Murakawa, Y., Takada, S., Ueda, Y., Suzuki, N., Hoshino, T., Sakane, T., Characterization of T lymphocyte subpopulations responsible for deficient interleukin 2 activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 134:187-194, 1985.
 - 9 - Huang, Y-P., Miescher, P.A., and Zubler, R.H., The interleukin 2 secretion defect in vitro in systemic lupus erythematosus is reversible in rested cultured T cells. *J Immunol.* 137:3515- 3520, 1986.
 - 10 - Miyagi, J., Minato, N., Suniyya, M., Kasahara, T., Kano, S., Two types of antibodies inhibiting interleukin-2 production by normal lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32:1256-1364, 1989.
 - 11 - Linker-Israeli, M., Quismorio, F., Horvitz, D., Further Characterization of interleukin-2 production by lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 15:1216-1222, 1988.
 - 12 - Hishikawa T., Tokano Y., Sekigawa I., Ando S., Takasaki Y., Hashimoto H., Hirose S., Okumura K., Abe M., and Shirai T., HLA-DP+ T cells and deficient Interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 55: 285-296, 1990.
 - 13 - Rees, R., Wiltrout, R., The biology and clinical applications of interleukin 2. *Immunol. Today* 11: 36-39, 1990.
 - 14 - Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., et al Interleukin-2 receptor b chain gene: generation of three receptor forms by cloned human a and b chain cDNAs. *Science* 244:551-554, 1989.
-

- 15.- Takeshita T, Asau H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Kunakata H, Nakamura M and Sngamura K. Cloning of the γ Chain of the Human IL-2 Receptor. *Science* 257: 379-382, 1992.
- 16.- Alcocer-Varela J, Alarcón Riquelme M, Laffon A, Sánchez Madrid F, and Alarcón Segovia D. Activation Markers on Peripheral Blood T Cells from Patients with Active or Inactive Systemic Lupus Erythematosus. Correlation with Proliferative Responses and Production of IL-2. *J Autoimmunity* 4:935-945, 1991.
- 17.- Al-Janadi M and Raziuddin S. B cell Hyperactivity is a function of T cell Derived Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 20: 1885-1891, 1993.
- 18.- Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM and June CH. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci* 86: 1333-1337, 1989.
- 19.- Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G and Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T-cell activation pathway. *Science* 244:239-243, 1989.
- 20.- Clement, LT: Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: Markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol* 12:1-10, 1992.
- 21.- Pulido, R, Sanchez-Madrid, F: Biochemical nature and topographic localization of epitopes defining four distinct CD45 antigen specificities. Conventional CD45, CD45R, 180KDa (UCHL-1) and 220/205/190 KDa. *J Immunol* 143:1930-1936, 1989.
- 22.- Pingel, JT, Thomas, ML: Evidence that the leukocyte common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. *Cell* 58:1055-1065, 1989.
- 23.- Martorell, J, Vilella, R, Borsche, L, Rojo, I, Vives J: A second signal for T cell mitogenesis provided by monoclonal antibodies CD45 (T200). *Eur J Immunol* 17:1447-1451, 1987.
- 24.- Ledbetter, JA, Rose, LM, Spooner, CE, Beatty, PG, Martin, PJ, Clark, EA: Antibodies to common leukocyte antigen p220 influence human T cell proliferation by modifying IL2 receptor expression. *J Immunol* 135:1819-1828, 1985.
- 25.- Mimura, T, Fernsten P, Jajour, W and Winfield JB: Autoantibodies specific for different isoforms of CD45 in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 653-656, 1990.
- 26.- Morimoto, C, Steinberg, A D, Letvin, N L, Hagan M, Takeuchi, T, Daley, J, Levine, H, Scholssman, S F: A defect of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematosus patients demonstrated with anti-2H4 antibody. *J Clin Invest* 79:762-768, 1987.
- 27.- Handwerker, B S: T-cell and B-cell function in lupus. *Curr Op Rheum* 3:757-779, 1991.
- 28.- Kallenberg, CGM, Van Dissel-Emiliani, F, Huitema, MG, Limburg, PC. The, TH: B-cell proliferation and differentiation in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *J Clin Immunol* 26:55-61, 1988.
- 29.- Tan, PL, Blumenstein, M, Yeomans, S, Watson, JD: B cell lymphokines in human systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 44:941-945, 1989.
- 30.- Alcocer Varela J., Alarcón Segovia D., Sredni B., and Albeck M . Effect of the novel immunoregulator AS-101 on in vitro functions of mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 77: 319-323, 1989.

-
- 31.- Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F.. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277, 1982.
- 32.- Guzmán J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sánchez-Guerrero J., Alarcón-Segovia, D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 19: 1551-1558, 1992.
- 33.- Gillis, S., Ferm, M.M., Ou, W. and Smith, K.A. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* 120: 2027, 1978.
- 34.- Mosmann, TR and Fong, TAT. Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods*. 116:151-170, 1989.
- 35.- Robb, R.J., and Rusk, C.M. High and low affinity receptors for interleukin-2: implications of pronase, phorbol ester and cell membrane studies upon the basis for differential ligand affinities. *J Immunol* 137:142, 1986.
- 36.- Chomczynski, P. & Sacchi, N. *Anal. Biochem.* 162:156, 1987.
- 37.- Llorente L, Richaud Patin Y, Widjenes J, Alcocer Varela J, Maillot MC, Durand-Gasselin I, Morel Fourrier B, Galanaud P and Emilie D. Spontaneous production of IL-10 by B lymphocytes and monocytes in Systemic Lupus Erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 4: 421-430, 1993.
- 38.- Kroemer, G., Wick, G. The role of interleukin 2 in autoimmunity. *Immunol Today* 10:246-251, 1989.
- 39.- Saiki, O., Tanaka, T., Kishimoto, S., Defective expression of p70/75 interleukin 2 receptor in T cells from patients with systemic lupus erythematosus: A possible defect in the process of increased intracellular calcium leading to p70/75 expression. *J Rheumatol* 17:1303-1307, 1990.
- 40.- Lorré, K., Damme, J.V., Ceuppens, J.. A bi-directional regulatory network involving IL2 and IL4 in the alternative CD2 pathway of T cell activation. *Eur J Immunol* 20:1569-1575, 1990.
- 41.- Akahoshi, T., Oppenheim, J., Matsushima, K.. Induction of high-affinity interleukin 1 receptor on human peripheral blood lymphocytes by glucocorticoid hormones. *J Exp Med* 167: 924- 936, 1988.
- 42.- Gillis, S., Crabtree, G.R., Smith, K. A.. Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I.- the effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J Immunol* 123:1624-1628, 1979.
- 43.- Rocha, B., Lembezat, M.P., Freitas, A., Bandeira, A. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 production in exponentially growing T cells: major differences between in vivo and in vitro proliferating T lymphocytes. *Eur J Immunol* 19:1137-1145, 1989.
- 44.- Lee KP, Taylor C, Petryniak B, Turka LA, June CH, and Thompson CB. The genomic organization of CD28. Implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. *J Immunol.* 145: 344-352, 1990.
- 45.- Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci.* 87:5031-5035, 1990.
- 46.- Schwartz, RH. Acquisition of immunologic self tolerance. *Cell* 57: 1074-1079, 1989.
- 47.- Alcocer-Varela J, Vidaller A, Llorente L., Alarcón-Segovia, D. Presence of an IL-3 producing suppressor T cell resistant to cyclosporin A in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 73: 424-429, 1988.
-

- 48.- Morimoto, C, Reinherz, E L, Distaso, J A, Steinberg, A D & Schlossman, S F. Relationship between systemic lupus erythematosus T cell subsets, anti-T-cell antibodies, and T cell functions. *J Clin Invest* 73:689-700, 1984.
- 49.- Raiziuddin, S, Nur, M A, Alwabel, A A. Increased circulating HLA-DR+ CD4+ T cells in systemic lupus erythematosus: alterations associated with prednisolone therapy. *Scand J Immunol* 31:139-145, 1990.
- 50.- Melendro, EJ, Saldate, C, Rivero SJ y Alarcón-Segovia D: T-cell subpoblations in the peripheral blood of patients with connective tissue diseases as determined by flow cytometry using monoclonal antibodies. *Clin Immunol Immunopathol* 27:340-347, 1983.
- 51.- Bakke, AC, Kirkland, PA, Kitridou, RC, et al: T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 26:745-750, 1983.
- 52.- Salmon, M, Kitas, GD, Bacon, PA: Production of lymphokine mRNA by CD45R+ and CD45R- helper T cells from human peripheral blood and by human CD4+ T cell clones. *J Immunol* 143:907-912, 1989.
- 53.- Swain, S L, Weinberg, A D, and English, M. CD4+ cell subsets: Lymphokine secretion of memory cells and of effector cells that develop from precursor in vitro. *J Immunol* 144:1788-1799, 1990.
- 54.- Oravecz, T, Monostori, E, Kurucz, E, Takacs, L and Ando, I. CD3-Induced T-cell proliferation and interleukin-2 secretion is modulated by the CD45 antigen. *Scand J Immunol* 34:531-537, 1991.
- 55.- Deans, JP, Shaw, J, Pearse, MJ and Pilarski, LM. CD45R as a primary signal transducer stimulating IL-2 and IL-2R mRNA synthesis by CD3-4-8- thymocytes. *J Immunol* 143:2425-2430, 1989.
- 56.- Fong, TAT and Mosmann, TR: Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 patterns of cytokines. *J Immunol* 144:1744-1752, 1990.
- 57.- Richaud Patin Y, Llorente L, Alcocer Varela J. Cytokine gene expression in circulating mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. (enviado a publicación).
- 58.- Roth MD. Interleukin 2 Induces the Expression of CD45RO and the Memory Phenotype by CD45RA+ Peripheral Blood Lymphocytes. *J Exp Med* 179: 857-864, 1994