

11281

16
33



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**INTERLEUQUINA-10 E INTERLEUQUINA-13 EN GLANDULA
SALIVAL Y CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE
PERIFERICA EN PACIENTES CON SINDROME DE
SJOGREN PRIMARIO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(INMUNOLOGIA)**

P R E S E N T A:

GILDA MARIA VILLARREAL MOLINA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGOSTO, 1996

**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 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.

Esta tesis se realizó en el departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán bajo la asesoría del Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela y la co-asesoría del Dr. Luis Llorente Peters

Agradecimientos:

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Jorge Alcocer Varela, por los conocimientos y el apoyo siempre brindados.

Al Dr. Luis Llorente Peters.

A los Dres. Alejandro García Carrancá, Héctor Mayani, Juan Pedro Laclette, Lino Díaz de León y Arnoldo Kraus.

A mis compañeros de laboratorio, residentes y personal del departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

A mi familia.

INDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCION	
I. Introducción General.....	8
II. Síndrome de Sjögren Primario	11
1) Etiología	12
a) Hormonas	12
b) Genética	13
c) Virus	14
2) Fisiopatología	15
Citocinas.....	17
Sangre periférica.....	19
III. Interleuquina-10	20
1) Efectos biológicos	
a) Inhibición de monocitos/macrófagos	22
b) Efectos sobre linfocitos T	23
c) Inhibición de células asesinas naturales.....	23
d) Estimulación de células B.....	23
2) Expresión de IL-10 en humanos	24
IV. Interleuquina-13.....	25
V. Justificación	26
OBJETIVOS	28
MATERIAL Y METODOS	
I. Pacientes	29
II. Citometría de Flujo	29
III. Análisis Citofluorométrico	30
IV. Purificación y Cultivo de Células Mononucleares de Sangre Periférica.....	31
V. Ensayo Funcional de IL-10	32
VI. Ensayos de ELISA para IL-10 e IL-13	32
VII. Ensayos de ELISA de Inmunoglobulinas IgM e IgA Totales.....	33
VIII. Obtención y Estimación Semicuantitativa del RNA	34
IX. Southern Blot.....	37
X. Análisis Estadístico	38
RESULTADOS	
I. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica en pacientes y controles.....	39
II. Expresión de los genes de citocinas por linfocitos T	43
III. Expresión de IL-10 e IL-13 por células mononucleares de sangre periférica	47

IV. Efectos in vitro de IL-10 recombinante y de Acn anti-IL-10 sobre la síntesis de inmunoglobulinas en pacientes con síndrome de Sjögren primario	51
V. Correlación entre la producción de IL-10 y subpoblaciones linfocitarias	53
VI. Expresión de los genes de IL-10 e IL-13 por las glándulas salivales	55
DISCUSION	58
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFIA	67
APENDICE	79

**INTERLEUKIN-10 AND INTERLEUKIN-13 IN SALIVARY GLANDS AND
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS WITH PRIMARY
SJÖGREN'S SYNDROME.**

SUMMARY

Primary Sjögren's syndrome (PSS) is an autoimmune disease characterized by lymphocytic infiltration of exocrine glands, B cell hyperactivity and autoantibody production. The aim of this study was to evaluate the peripheral blood lymphocyte subpopulations, and to determine the presence of interleukin (IL)-10 and IL-13 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and salivary glands in patients with this disease. Twenty patients and 15 healthy controls were included in this study. We found a decreased percentage of CD4+ cells and a higher percentage of CD8+ cells in patients as compared to controls. In both, CD4+ cells and CD8+ cells, CD25 antigen was overexpressed. We found a high expression of the IL-10 gene and its product by their PBMC as well as by their salivary glands. Peripheral blood B cells and monocytes were responsible for 89% of total IL-10 secretion. IL-13 gene expression was confined to PSS salivary glands. Our results suggest that IL-10 and IL-13 contribute to the pathogenesis of PSS and might explain the B cell abnormalities and the development of lymphoma observed in this autoimmune disease.

RESUMEN

El síndrome de Sjögren primario (SSP) es una enfermedad autoinmune caracterizada por un infiltrado linfocitario de las glándulas exócrinas, hiperactividad de las células B y producción de autoanticuerpos. El objetivo de este trabajo fue estudiar las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica y la presencia de interleuquina (IL)-10 e IL-13 en células mononucleares de sangre periférica y en glándulas salivales menores de pacientes con SSP. Se estudió un total de 20 pacientes con SSP y 15 controles sanos. Los pacientes tuvieron un porcentaje y número menor de células CD4+, y un aumento de las células CD8+, en relación a los controles. En ambas poblaciones celulares se encontró incrementada la expresión del antígeno CD25. El gen de IL-10 y su producto se expresó más en el grupo de pacientes que en los controles tanto en las células mononucleares (CMN) de sangre periférica, como en las glándulas salivales menores. Las células B y los macrófagos fueron responsables del 89% de la producción total de IL-10. Las CMN de 11 (de 14) pacientes y todos los controles no expresaron IL-13. La expresión del gen de IL-13 estuvo confinada a la glándula salival en 5 (de 7) pacientes quienes fueron positivos para esta citocina, y ninguno de los controles fueron positivos para ella. Estos hallazgos sugieren que la IL-10 y la IL-13 podrían participar en la patogénesis del SSP y esto podría ayudar a explicar las anomalías de los linfocitos B (L-B) y el desarrollo de linfomas observados en esta enfermedad.

INTRODUCCION

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

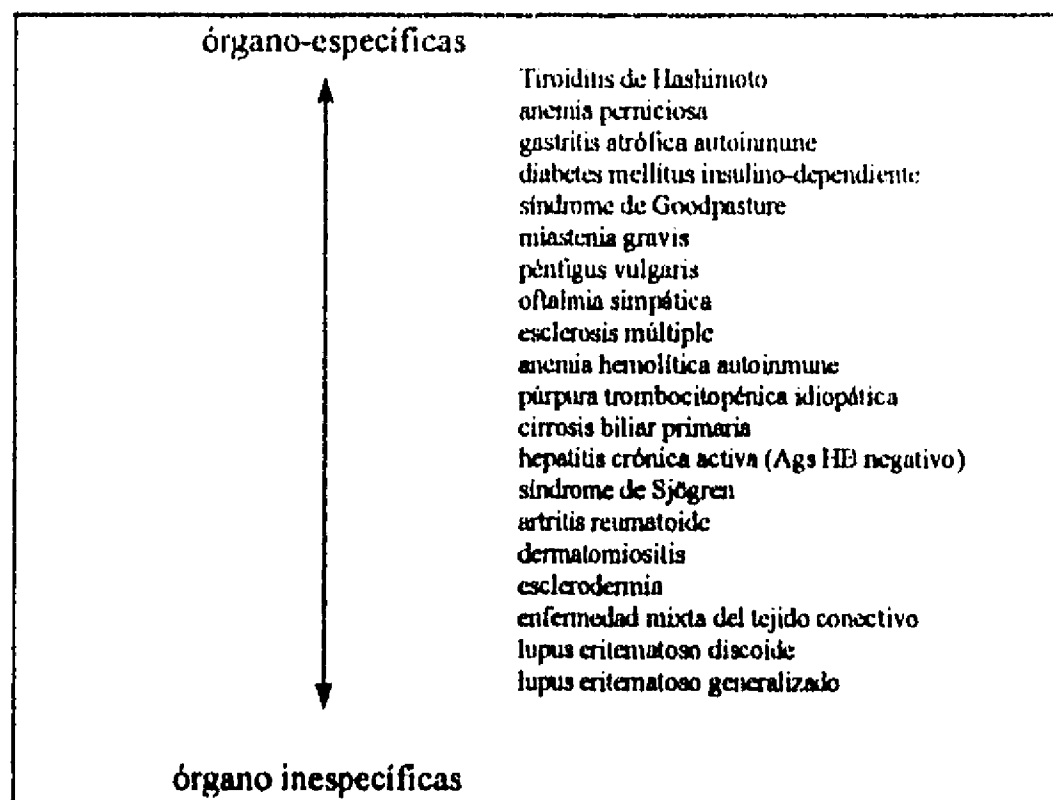
La ruptura inmunológica de la discriminación entre lo propio y lo no propio sigue siendo uno de los mayores enigmas de la Inmunología. Sin embargo, en los últimos años, han habido avances importantes en el conocimiento de la patogénesis de la autoinmunidad, y se han precisado algunas nociones:

Primero, los individuos sanos poseen linfocitos B autorreactivos, productores de auto-anticuerpos (auto-anticuerpos naturales)³². Es decir, la autoinmunidad es un fenómeno común y puede observarse en diversas condiciones tales como en la vejez, infecciones, daño tisular o en el cáncer. Segundo, se piensa que el desarrollo de las enfermedades autoinmunes depende de la conjunción de varios factores: genéticos (ejemplo: el HLA), hormonales (como los niveles de estrógenos) y ambientales (infecciones bacterianas o virales, daño tisular por luz ultravioleta o por fármacos)^{1,62}. Tercero, un fenómeno

esencial en la generación de patologías autoinmunes es la activación de linfocitos T autorreactivos, que también están presentes en sujetos sanos. Probablemente es así como se genera una cascada de mecanismos tanto celulares como humorales auto-perpetuados, que terminan en daño tisular y finalmente en enfermedad.

Los padecimientos de base autoinmune tienden a distribuirse dentro de un espectro. En uno de los extremos, tanto los auto-anticuerpos como la lesión invasiva destructiva se dirigen a un solo órgano (por ejemplo, la tiroiditis de Hashimoto). En el límite opuesto están los padecimientos autoinmunes generalizados, con anticuerpos dirigidos hacia autoantígenos que se encuentran en un amplio espectro de sitios del cuerpo y también las lesiones características de ellos están diseminadas. Los mecanismos del daño autoinmune varían dependiendo de la posición que ocupe cada padecimiento dentro de este espectro. Así, en las órgano-específicas, las reacciones más frecuentes son las mediadas por células y de hipersensibilidad tipo II (respuestas tipo T_{H1}); mientras que en las órgano-inespecíficas, se ha encontrado que el tipo de respuesta inmune es más heterogéneo⁹⁸. En el extremo de los padecimientos autoinmunes órgano-inespecíficos se encuentran las enfermedades reumatológicas, siendo la más generalizada el lupus eritematoso sistémico y la menos generalizada, quizás, el síndrome de Sjögren primario.

Figura 1.
Espectro de las enfermedades autoinmunes.



Las enfermedades autoinmunes pueden clasificarse ya sea como órgano específicas u órgano inespecíficas dependiendo de la respuesta inmune: si está dirigida principalmente hacia antígenos localizados en órganos específicos, o a antígenos situados en varios órganos. (Tomado de Clinical Immunology, Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM. Gower Medical Publishing pp 4.3, 1991).

El síndrome de Sjögren se caracteriza por la infiltración linfocitaria de las glándulas exócrinas, y por una secreción glandular disminuida o ausente, por lo que estos pacientes presentan queratoconjuntivitis sicca y xerostomía. Tiene un espectro clínico amplio, que va desde una exocrinopatía restringida hasta un proceso generalizado, con manifestaciones extraglandulares en pulmón, riñón y sistema nervioso¹²¹. Este padecimiento ocurre tanto en forma aislada (síndrome de Sjögren

primario) como en asociación con otras enfermedades autoinmunes (síndrome de Sjögren secundario)⁴³. Del 6 al 10% de los pacientes también desarrollan pseudolinfoma o linfoma no-Hodgkin de linfocitos B de lento desarrollo (IgM κ)^{62,108,119}. Estas características confieren al síndrome de Sjögren una situación ideal para la investigación sobre autoinmunidad y malignidad.

II. SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO.

La prevalencia del SSP varía entre el 1 y 3 % de la población adulta y afecta principalmente a mujeres (9 mujeres por cada hombre) con un promedio de 52 años de edad (desde 17 hasta 75 años)⁴³.

Aunque no hay un criterio universal para el diagnóstico del SSP, los más aceptados toman en cuenta los siguientes puntos^{8,26,113,128}.

1) Sequedad ocular con síntomas y signos objetivos:

- Prueba de Schirmer de menos de 5 mm de humedad por 5 min.
- Prueba de Rosa de Bengala positiva o tinción por fluoresceína de la córnea y conjuntiva para demostrar queratoconjuntivitis sicca.

2) Síntomas y signos objetivos de sequedad oral:

- Disminución de la velocidad de flujo de la parótida usando tazas de Lashley u otros métodos.
- Biopsia de glándula salival menor anormal (2 ó más focos de 50 ó más linfocitos en un promedio de 4 lóbulos evaluables).

3) Evidencia de autoinmunidad:

- Hipergammaglobulinemia.
- Factor reumatoide elevado $\geq 1:320$
- Anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia $\geq 1:320$
- Anticuerpos anti-SSA (Ro) y/o anti-SSB (La)³.

4) Ausencia de otra enfermedad autoinmune asociada, como artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado, polimiositis, escleroderma, sarcoidosis, linfoma preexistente, inmunodeficiencia adquirida, o alguna otra causa conocida de queratoconjuntivitis sicca o de crecimiento de glándula salival.

1) Etiología.

Se desconoce la causa de esta enfermedad. Se considera probable que exista una interacción entre factores constitutivos (como hormonas y el sistema principal de histocompatibilidad) y ambientales (como virus) que den lugar a este padecimiento autoinmune.

a) Hormonas

El hecho que predomine en mujeres hace suponer que los factores hormonales tienen un papel en su etiopatogénesis. Los estrógenos facilitan la respuesta inmune¹⁰⁵, sin embargo, el SSP no mejora con la menopausia, y la administración de estrógenos no agrava las manifestaciones de este padecimiento. Por ello, la predominancia en las

mujeres no puede explicarse sólo por la acción de los estrógenos, por lo que aún está por definirse el papel del factor hormonal en el desarrollo del síndrome de Sjögren

b) Genética

El 50% de los pacientes caucásicos con síndrome de Sjögren primario presentan los antígenos de histocompatibilidad HLA-DR3 y los genes ligados B8, DQ2 y el alelo nulo de C4⁸⁶. Sin embargo, este haplotipo es frecuente en la población sana (20-25%) y sus integrantes están en desequilibrio de unión. Por esto ha sido difícil precisar los componentes que en realidad confieren un riesgo para desarrollar síndrome de Sjögren primario. Los genes de la respuesta inmune podrían estar implicados más en la especificidad de los anticuerpos que en la susceptibilidad al síndrome de Sjögren primario^{4,86}. Se ha observado que en pacientes caucásicos con anticuerpos anti-SSA/anti-SSB positivos, la frecuencia de DR3 es de 60 a 90% tanto en síndrome de Sjögren primario como en lupus; y que los pacientes heterocigotos DQw1/DQw2 tienen niveles mayores de anticuerpos anti-Ro^{47,54,55}. En cambio, en pacientes italianos y griegos las asociaciones son sólo con DR5 y no con DR3^{88,129}. Esta discrepancia aparente puede aclararse por el hecho de que el alelo DQA1 está en desequilibrio genético con los haplotipos tanto DR3 como DR5. Es así que el alelo DQA1 atraviesa la barrera étnica y se asocia con esta respuesta en diferentes poblaciones. Incluso un grupo de autores ha propuesto que la glutamina en la posición 34 de la cadena DQA1 y la leucina en la posición 26 de la cadena DQB1 son importantes en la regulación de la respuesta anti-Ro/anti-La^{97,107}.

c) Virus

En los últimos años se han descrito una serie de asociaciones entre diversas infecciones virales y el síndrome de Sjögren^{18,30,68,126}. Estas asociaciones se fundamentan en que la glándula salival es el lugar de latencia de una serie de virus, que el antígeno La tiene un papel en el procesamiento de los RNA virales¹⁰⁸, y que los virus pueden causar la expresión de La en la membrana celular⁸, un incremento en la expresión del IFN- γ y de las moléculas de clase II en los ductos y *acini* de la glándula salival, fenómenos observados en esta enfermedad. Además, se han descrito exocrinopatías semejantes al síndrome de Sjögren en situaciones asociadas al HTLV-1⁵², en individuos infectados con HIV, y en sujetos con infección por virus de hepatitis C⁷⁵. Los agentes descritos hasta hoy son principalmente el virus de Epstein Barr (EBV), el virus de Herpes tipo 6 y el virus linfotrópico tipo I^{41,45,53,60,126}.

El EBV se ha implicado fundamentalmente en la patogénesis del síndrome de Sjögren primario por diversas razones. La glándula salival es el sitio de latencia y de reactivación del EBV, y se encuentra en linfomas de linfocitos B (L-B), en padecimientos inmunoproliferativos, en pacientes inmunosuprimidos y en sujetos que han desarrollado SSP después de padecer mononucleosis infecciosa^{40,131}.

Otros hallazgos experimentales relevante que apoyan esta hipótesis son:

Los pacientes con síndrome de Sjögren primario tienen un incremento de anticuerpos a antígeno nuclear del virus de Epstein Barr⁶⁰. Los anticuerpos anti-SSB están dirigidos a una proteína ribonuclear que se asocia selectivamente al RNA del EBV¹⁰⁶. Hay un aumento estadísticamente significativo de la dosis infecciosa-50% de EBV producido por líneas de linfocitos B provenientes de pacientes con síndrome de Sjögren en comparación con las de pacientes con lupus eritematoso generalizado o artritis

reumatoide. El DNA de este virus está incrementado en los pacientes con síndrome de Sjögren: se ha observado mediante experimentos de reacción en cadena de la polimerasa que 78% de las glándulas salivales de los pacientes con síndrome de Sjögren tienen más de una copia de DNA del EBV por cada 100,000 células, esto en contraste con 13% de glándulas salivales normales. En células mononucleares de sangre periférica no se encontró esta diferencia entre pacientes y controles donde del 12 al 18% de los pacientes y el 10% de los controles tenían más de una copia de DNA de EBV por cada 100,000 células ¹⁰³.

Todos estos datos permitirían concluir que el EBV se encuentra de manera incrementada en pacientes con síndrome de Sjögren en comparación con sujetos sanos e incluso con sujetos con otras enfermedades autoinmunes, por lo que el EBV puede contribuir en la patogénesis, o bien puede encontrarse reactivado en estos pacientes.

2) Fisiopatología.

Quizás los hallazgos más característicos del SSP son el infiltrado linfocitario en las glándulas salivales y la hiperactividad de las células B de sangre periférica que da lugar a hipergammaglobulinemia, presencia de factor reumatoide, y anticuerpos anti-Ro y anti-La²¹. Las investigaciones se han dirigido principalmente a definir la composición de los infiltrados linfocitarios y los mecanismos que pudieran participar en su generación y persistencia.

La mayor parte de las células mononucleares que se encuentran en el infiltrado son linfocitos T (CD3+). Las células T supresoras-citotóxicas (CD8+) conforman del 10

al 20% del infiltrado. De las células CD3+, 77 % son linfocitos T (L-T) de memoria (CD45RO), sólo el 2.8% expresan el receptor γ/δ de células T y casi todos expresan el receptor α/β ¹¹¹. A pesar de que el repertorio de L-T no tiene restricción total²⁰, en la glándula salival se ha descrito una sobreexpresión de las familias V β 2 y V β 13¹¹⁶. Esto último no se ha encontrado en sangre periférica¹³⁴.

Las células T rodean los linfocitos B, que constituyen del 10 al 20% del infiltrado. El 5 al 10% restante, está compuesto por células asesinas naturales (NK) y por monocitos.

La acumulación linfocitaria es focal y alrededor de los ductos, y en menor proporción se encuentran en los *acini* de las glándulas salivales. Se ha descrito que las células epiteliales de los ductos expresan antígenos de clase II (principalmente DR) del sistema principal de histocompatibilidad^{40,85,70,84} y en menor grado moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1, LFA-1). Los linfocitos también expresan ICAM-1¹¹¹, aunque estos hallazgos no se han confirmado del todo¹⁵.

Las células T infiltrantes también tienen una mayor expresión de moléculas de clase II del sistema principal de histocompatibilidad, del antígeno asociado a función linfocitaria (LFA-1), del receptor de interleuquina-2 (RNAm) y de RNAm de IL-2, lo cual sugiere que los L-T están activados^{18,44,95,101}. Las células B probablemente también estén activadas. De hecho, desde 1970 se demostró que éstas son capaces de producir *in vitro* grandes cantidades de auto-anticuerpos, siendo los isotipos más frecuentes IgG e IgM¹¹⁸ (en cambio, IgA predomina en individuos sanos). La proliferación oligoclonal de los L-B podría iniciarse en la glándula salival, y con el tiempo dar lugar a linfomas^{46,87,91,112,125}.

Se han estudiado también algunas subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica, y se han encontrado diversas alteraciones que pudieran explicar algunas de las anomalías inmunológicas del SSP. Sin embargo, estos estudios no han sido concluyentes^{5,57,58,59,78}. Así, por ejemplo, se ha descrito una disminución en el número de células T de ayuda (CD4+), y de linfocitos T supresores (CD8+), un defecto cuantitativo en células T supresoras/inductoras (CD4 2H4+)¹⁰⁴, y un aumento en linfocitos B CD5+^{61,132}. También se ha reportado una disminución en el número y en la función de células NK¹¹⁵.

Citocinas

Las citocinas tienen un papel central en la regulación de la respuesta inmune. Son polipéptidos o glicoproteínas con un peso molecular mayor a 8 kDa. Son producidas principalmente (aunque no exclusivamente) por células del sistema inmune. Ejercen sus funciones al unirse a receptores de membrana específicos y de alta afinidad (K_d desde 10^{-9} hasta 10^{-12}). Su producción generalmente es transitoria, y su radio de acción, corto (típicamente autócrino o parácrino y no endócrino).

Las citocinas ejercen sus acciones biológicas en el contexto de una red de citocinas. Sus acciones de estimulación y regulación celular son redundantes y pueden actuar sobre una serie diversa de células y ejercer diferentes acciones sobre ellas, i.e. son pleiotrópicas.

Se han descrito algunas anomalías en la producción de citocinas en pacientes con síndrome de Sjögren, que intentan explicar algunas alteraciones de este padecimiento⁶⁶.

Diversos estudios han mostrado la presencia de interferón (IFN)- γ en biopsias de glándula salival, en particular en los ductos, principalmente en epitelio, células infiltrantes y vasos sanguíneos. También se ha encontrado una correlación importante entre la expresión de moléculas DR del HLA, la cantidad de IFN- γ , y el número y distribución de los infiltrados linfocitarios en estas biopsias. También se ha demostrado que los linfocitos eluidos de las glándulas salivales de estos pacientes producen un factor soluble que estimula la síntesis de HLA-DR en una línea celular derivada de glándula salival. Los sobrenadantes de los cultivos contenían IFN- γ y su acción sobre la síntesis de HLA-DR se bloqueó con anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ ⁴⁴. Estos estudios apoyan la hipótesis de que el IFN- γ secretado por linfocitos infiltrantes se une a receptores del epitelio, y da lugar a la expresión de antígenos de clase II y a la presentación de antígeno (probablemente viral y/o autoantígeno) a las células T.

Además del IFN- γ se han encontrado otros productos de activación de células T. Después de estimulación con mitógenos, la producción de IL-2 por los linfocitos de glándula salival está incrementada y en cambio en los linfocitos de sangre periférica, se encuentra disminuida⁴⁴. Además de demostrar activación de células T en la glándula salival, este estudio prueba que el sitio de inflamación difiere de aquél en sangre periférica del mismo paciente.

Los ratones en quienes se elimina el gen del factor transformante de crecimiento (TGF)- β (ratones TGF- β "knockout"), desarrollan una enfermedad inflamatoria multifocal, con una lesión en glándula salival semejante a la que presentan los

pacientes con síndrome de Sjögren primario ¹¹⁰. Esto podría sugerir que el TGF-β es protector contra el síndrome de Sjögren en animales sanos. Sin embargo, los estudios en humanos no son concluyentes. Esta citocina se ha detectado en las lesiones con infiltrado mínimo, no así en las glándulas de pacientes con infiltrados intensos. Estos hallazgos son consistentes con su conocida función inhibitoria y apoyan los datos encontrados en ratones "knockout". Sin embargo, en otro estudio se detectó TGF-β en 2 de 8 biopsias de pacientes con SS pero no se encontró ninguna relación con el grado de inflamación. Son necesarios más estudios para determinar el papel real del TGF-β en el síndrome de Sjögren primario.

Sangre periférica.

En sangre periférica, algunos estudios han descrito una disminución de la producción y respuesta a IL-2 por linfocitos de sangre periférica ⁵⁰, y niveles séricos incrementados de IFN-γ ².

Todos estos hallazgos son interesantes, y han intentado explicar el fenómeno del aumento de la expresión de antígenos de clase II del sistema principal de histocompatibilidad, y algunas manifestaciones que acompañan a la activación de los linfocitos T. Sin embargo, la hiperactividad de los linfocitos B, que es un fenómeno esencial del SSP, y que se traduce en hipergammaglobulinemia, y producción de autoanticuerpos como el factor reumatoide, anticuerpos anti-Ro y anti-La aún no se ha

resuelto. Al respecto, solamente se ha descrito la presencia de IL-6 en el suero y la de IL-4 en las glándulas salivales de estos pacientes^{2,42}.

Tanto interleuquina-10 como interleuquina-13 podrían participar en la patología observada en el síndrome de Sjögren primario, ya que se producen por activación de linfocitos T, y tienen un papel muy importante en la hiperactividad de las células B.

III. INTERLEUQUINA-10.^{81,82}

El gen de IL-10 se encuentra en el cromosoma 1 del humano, y codifica una proteína no glicosilada de 160 aminoácidos, de aproximadamente 18 kDa.

Sorprendentemente, la secuencia de aminoácidos de la IL-10 humana tiene 84% de homología con el BCRF1, producto de un marco abierto de lectura del genoma del EBV (con un 71% de homología en su secuencia nucleotídica)^{80,127}. Esto sugiere que la secuencia de aminoácidos se ha conservado debido a selección evolutiva a nivel protéico. Dado que el gen de IL-10 del ratón contiene intrones mientras que el del BCRF1 no, parecería que el que el EBV adquirió el gen de IL-10 a partir del genoma de mamíferos, posiblemente vía transcripción reversa, ya que la ausencia de intrones del BCRF1 es consistente con su origen a partir de RNAm más que de DNA genómico. Además, el producto del gen de BCRF1 tiene un peso molecular semejante a la IL-10 humana y murina, y presenta actividad de IL-10 en células humanas, particularmente en ensayos con macrófagos y células B humanas^{28,56,100}. Por tanto parecería que el

EBV hubiera capturado un gen de IL-10 de un mamífero, y lo mantuvo con el propósito de interferir con la respuesta inmune.

En el ratón, IL-10 es producida por clonas de células T de ayuda tipo T_{H2} (que participan en la estimulación de las respuestas humorales e inhibición de macrófagos) y T_{H0} , y no por clonas T_{H1} (que se asocian a respuestas de hipersensibilidad retardada) ni células CD8+. En todos estos casos la secreción de la IL-10 no es espontánea, sino que se produce después de estimulación policlonal o antigénica. La mayoría, aunque no todas las células T en el humano producen IL-10, incluso las células tipo T_{H2} y los linfocitos T que producen interferón (IFN)- γ , pero nada o casi nada de IL-4³¹. Otra fuente importante de IL-10 son los macrófagos después de ser activados, y también se ha demostrado que los queratinocitos pueden producirla.

Además de las células T, en el ratón IL-10 se expresa en linfocitos B normales estimulados, siendo el subgrupo de L-B Ly-1+ (el equivalente de los L-B CD5+ en el humano) el responsable de la mayor parte de la producción de IL-10 por los L-B. En el humano, las células B también son capaces de producir IL-10, especialmente después de ser transformados por el EBV^{7,14}.

Pese a que la expresión de IL-10 durante las respuestas *in vivo* se correlaciona frecuentemente con respuestas globales tipo T_{H2} , éste no es siempre el caso, como podría esperarse del número distinto de tipos celulares que pueden sintetizar IL-10. Incluso entre las células T, se han encontrado otros patrones de citocinas en las clonas de células T tanto humanas como murinas, por lo que la dicotomía extrema T_{H1} y T_{H2} no puede explicar todas las repuestas inmunológicas.

1) Efectos biológicos.

En general, la interleuquina-10 es un potente agente anti-inflamatorio y estimula la proliferación y activación de los linfocitos B. Al igual que otras citocinas, IL-10 media una serie de funciones en diversas células.

a) Inhibición de macrófagos/monocitos.

La IL-10 inhibe la producción de una serie de citocinas (IL-1, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, factor de necrosis tumoral, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12), producto de los macrófagos activados con lipopolisacárido^{29,37}. Esto parece ser a través del aumento de la degradación del RNAm de ellas¹⁰, y mediante un mecanismo indirecto, por la inhibición de la síntesis de IL-12 por los macrófagos. La interleuquina-10 se secreta más tarde que otras citocinas producidas por macrófagos por activación, de modo que pueden secretar cantidades importantes de otras citocinas antes de que ocurra la inhibición por IL-10. El IFN- γ también inhibe la producción de IL-10. De este modo en ciertas circunstancias cada una inhibe la síntesis de la otra, y así participan ambas en una red de inhibición cruzada. Secundaria a la inhibición de citocinas, la IL-10 también modifica las funciones citotóxicas de los macrófagos. También inhibe la expresión de moléculas de clase II del sistema principal de histocompatibilidad en ciertas clases de monocitos/macrófagos, pero estimula la expresión de Fc γ RI en monocitos humanos¹²³.

b) Efectos sobre linfocitos T.

La IL-10 inhibe la síntesis de citocinas producidas por clones T_{H1} por un mecanismo indirecto como el descrito en la sección anterior. IL-10 también inhibe la producción de IFN- γ por células T citotóxicas. También de modo indirecto, reduce la producción de IL-2, inhibiendo así la proliferación de L-T cuando la producción de IL-2 es reducida.

En cambio, IL-10 aumenta la proliferación de L-T periféricos, y particularmente L-T tímicos inducida por IL-2 e IL-4⁷³. También es un factor de proliferación y diferenciación de los L-T CD8+, e incrementa tanto la frecuencia de precursores como la actividad citolítica de las clonas expandidas en cultivos de dilución limitada en sinergia con IL-2²².

c) Inhibición de células asesinas naturales.

La IL-10 inhibe la producción de IFN- γ por células asesinas naturales que responden a IL-2 en presencia de macrófagos. Posiblemente el efecto inhibitorio de la IL-10 sobre las células asesinas naturales sea indirecto, mediante la inhibición de la síntesis de IL-12 por los monocitos. Por tanto la IL-10 inhibe la síntesis por los principales productores de IFN- γ : células T_{H1} , T-CD8+ y células asesinas naturales.

d) Estimulación de células B.

La mayoría de los efectos de IL-10 sobre los linfocitos B son de estimulación. IL-10 induce la expresión de moléculas de clase II del SPH pero no del antígeno CD23 (receptor Fc- ϵ) en las células B en reposo. También aumenta la supervivencia de los L-B en reposo en cultivo⁵¹ e induce potentemente la proliferación de los L-B que han sido

activados por anticuerpos anti-CD40¹⁰⁰. Estos efectos estimulatorios son aditivos en presencia de IL-4. También induce la diferenciación de L-B humanos. Las células B activadas y en presencia de IL-10, secretan grandes cantidades de IgG, IgA e IgM, y algunas células B activadas con anticuerpos anti-CD40 adquieren morfología de células plasmáticas.

2) Expresión de IL-10 en humanos.

Como se mencionó previamente, la expresión de IL-10 por células humanas correlaciona frecuentemente con una respuesta tipo T_{H2}. Por ejemplo, en lesiones de lepra lepromatosa (donde hay un incremento en la producción de anticuerpos) se expresa más fuertemente RNAm de IL-10, que en lepra tuberculosa, en donde las reacciones del tipo de hipersensibilidad retardada tienen un papel importante. La IL-10 también está elevada durante las reacciones crónicas de injerto contra huésped. Se ha sugerido que las reacciones agudas de injerto contra huésped están mediadas por citocinas pro-inflamatorias, y que puede inhibirse por citocinas del tipo T_{H2}.

En conclusión, la IL-10 tiene una variedad de funciones que incluyen la inhibición de la función y activación de los macrófagos. A pesar de que IL-10 es producida por una serie de células, la producción *in vivo* de IL-10 se asocia frecuentemente a respuestas del tipo T_{H2} y a la supresión de inmunidad mediada por células. El patrón de la producción *in vivo* de IL-10 sugiere que no es indispensable cuando se requiere de una respuesta de hipersensibilidad retardada, como durante las infecciones de diversos patógenos intracelulares. En cambio, la inhibición de las respuestas de hipersensibilidad retardada por IL-10 podría ser ventajosa durante la

autoinmunidad en general, y concretamente en el SSP, ya que las respuestas fuertes tipo T_{H1} (IFN- γ) podrían causar daño agudo mientras que las respuestas del tipo T_{H2} podrían causar un daño menor y ser mejor toleradas por los pacientes.

IV. INTERLEUQUINA-13^{124,135}

La interleuquina 13 (P600) es una citocina de reciente descripción, producida principalmente por L- T_{H2} activados, tanto en el humano como en el ratón^{13,24}. La IL-13 es secretada principalmente como una proteína no glicosilada de 132 aminoácidos y un peso molecular de 10,000 Da⁷⁴. En el humano, el gen de IL-13 se encuentra como una sola copia en el cromosoma 5, y abarca 4.6 Kb.

En el ratón, es producida principalmente por L- T_{H2} . La IL-13 induce la proliferación de la línea celular humana premeioide TF-1. También induce cambios en la morfología de los monocitos humanos, y en el fenotipo tanto de los monocitos como de las células B mediante la inducción de un incremento en la expresión de moléculas clase II del sistema principal de histocompatibilidad y del receptor de baja afinidad de IgE (Fc ϵ RII; CD23). También induce la proliferación de L-B, afectando principalmente los L-B sIgD+ vírgenes, e induce cambio de isotipo a IgE. En presencia de clones de células T o del ligando de CD40, IL-13 induce la síntesis de IgG4 y de IgE⁸⁹. La IL-13 además potencia la síntesis de DNA por los L-B, inducida por IL-2³⁰.

La IL-13 parece ser un regulador potente de las respuestas inflamatorias e inmunológicas, principalmente en cuanto a la función de los monocitos/macrófagos, ya

que inhibe la producción de citocinas inflamatorias (IL-1 α/β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, MIP-1a, GM-CSF, IFN- α y TNF- α) en respuesta a IFN- γ o lipopolisacárido^{27,70}. También induce la expresión del antagonista del receptor de IL-1 en monocitos activados con lipopolisacárido. Se ha observado que IL-13 recombinante inhibe la replicación del HIV en cultivos de macrófagos humanos, pero no de otros linfocitos.

De esta manera, la IL-13 podría tener un potente efecto antiinflamatorio. Es más, mediante la inhibición de IL-10 e IL-12 podría afectar la regulación cruzada de los subgrupos T_{H1} y T_{H2}, ya que, como se menciona en la sección anterior, la IL-10 tiene efectos supresores sobre las citocinas inflamatorias (T_{H1}), y la IL-12 tiene un papel importante en el desarrollo de las células tipo T_{H1}.

Por tanto, de manera global podría decirse que la IL-13 es una citocina pleiotrópica que inhibe potentemente la producción de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos, estimula la producción de anticuerpos, y juega un papel del tipo "T_{H2}" junto con la IL-10.

V. JUSTIFICACIÓN

Las funciones descritas de interleuquina-10 e interleuquina-13 en la inhibición de la activación de macrófagos y de la producción de IFN- γ , sugieren que podrían inhibir el desarrollo de respuestas celulares del tipo T_{H1}. De este modo, durante la autoinmunidad, las respuestas T_{H2} podrían dar lugar a un ataque mínimo o crónico en contraste a un rechazo o daño más agudo causado por mecanismos del tipo T_{H1}, y por lo tanto, un exceso en la producción de IL-10 y de IL-13 podría ser benéfico.

El *status* inmunológico en el síndrome de Sjögren primario consiste en una función normal o exacerbada de las células de estirpe T e hiperactividad de las células B. Es posible incluir a IL-10 y a IL-13 como moléculas con una participación activa, y en parte responsables de la alteración inmune que se observa en el síndrome de Sjögren primario. Dos circunstancias -no mutuamente excluyentes- podrían estar ocurriendo: por una parte la activación crónica de las células T conllevaría la síntesis tanto de la IL-10 como de la IL-13, cuya acción parácrina repercutiría sobre el linfocito B como célula blanco con el consecuente efecto de proliferación, diferenciación e hipergammaglobulinemia resultante. Por otra, el estado basal de hiperactividad del linfocito B podría ser consecuencia de autoestimulación, i.e., que IL-10 e IL-13 actuaran en forma autócrina.

En este proyecto de tesis se pretende estudiar la participación de IL-10 y de IL-13 en el síndrome de Sjögren primario, cuantificando su expresión en glándula salival y en sangre periférica.

OBJETIVOS:

1. Determinar la producción de IL-10 e IL-13 en síndrome de Sjögren primario en el sitio de lesión (glándula salival) en muestras de pacientes y en individuos sanos.
2. Determinar la producción de IL-10 e IL-13 por linfocitos T, B y monocitos, y de células mononucleares totales de sangre periférica, de pacientes con síndrome de Sjögren primario y de sujetos sanos.
3. Caracterizar antígenos de superficie de las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica para: linfocitos T totales (CD3+), L-T de ayuda (CD4+), L-T supresores (CD8+/CD3+), L-B (CD19+), L-B CD5+, monocitos (CD14+), células NK (CD56+), L-T de ayuda activados (CD4+/CD25+) y L-T supresores activados (CD8+/CD25+).
4. Comparar la(s) población(es) responsable(s) de la producción de IL-10 e IL-13 con la expresión de los antígenos de superficie.
5. Establecer si los resultados anteriores se relacionan con la presencia del síndrome de Sjögren primario.

MATERIAL Y MÉTODOS.

I. PACIENTES.

Para el estudio se seleccionaron de manera aleatoria un total de 20 pacientes (19 mujeres y un hombre) con diagnóstico de SSP. Todos los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo a los criterios de Moutsopoulos^{12b}. Su edad promedio fue de 46.9 años (de 29 a 82 años). Doce pacientes no estaban recibiendo tratamiento alguno en el momento del estudio. Cinco estaban bajo tratamiento antiinflamatorio no esteroideo, y tres recibían prednisona. Otros datos clínicos que pudieran ser relevantes se encuentran resumidos en el anexo.

Se estudiaron 15 sujetos sanos como controles (edad promedio 45.2 ± 17.8 años).

II. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se obtuvo la sangre periférica en presencia de EDTA al 0.2%. Se colocaron por separado en tubos Falcon de 5 ml (Becton Dickinson, San José, CA), 15 μ l de cada anticuerpo (Ac) monoclonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) más 150 μ l de sangre completa, se mezclaron y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente con agitación suave e intermitente. Se añadieron 2 ml de

solución de lisis para FACS (Becton Dickinson) por 10 min y se centrifugaron las células a 1500 r.p.m. por 5 min. Estas se lavaron con PBS y se resuspendieron en formaldehído al 3% en PBS, pH 7.2. Las muestras se almacenaron a 4°C protegidas de la luz, y se analizaron dentro de las primeras 24 horas después de su preparación. Se tiñó la superficie celular con Ac monoclonal específico del antígeno de superficie en cuestión marcado con FITC o PE. Se usaron 2 Ac monoclonales como controles isotípicos para descartar interacciones inespecíficas. Todos los Ac monoclonales se obtuvieron de Beckton Dickinson e incluyeron Ac contra los marcadores de superficie CD45, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD19, CD25 y CD56.

III. ANÁLISIS CITOFUOROMÉTRICO.

Las subpoblaciones linfocitarias se enumeraron mediante los métodos estándar, en un citómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson¹⁷. Se definió la ventana del análisis tanto por el desvío de la luz frontal y lateral como por inmunofluorescencia (CD45)⁷¹. Se determinó la proporción de los linfocitos en las preparaciones y se incluyó en la ventana del análisis a más del 98% de la población estudiada. Para cada determinación se incluyeron 10,000 eventos. Se calcularon los números absolutos después de la corrección de la población no linfocitaria en la ventana, multiplicando la cuenta total leucocitaria en sangre periférica por el porcentaje corregido de células teñidas por el marcador de superficie en cuestión.

IV. PURIFICACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

A partir de 30 ml de sangre periférica, se separaron las células mononucleares (CMN) mediante un gradiente de centrifugación con Hystopaque. Después de lavar las CMN 2 veces con PBS, se congelaron inmediatamente a -70°C botones de 5 hasta 10 millones de éstas. En algunos experimentos, se separaron las subpoblaciones celulares (L-T, L-B y monocitos) como sigue: se cultivaron a una concentración de 5 millones de células por ml en RPMI durante 3 h en cajas de Petri de plástico, y las células adherentes se recuperaron después de 1 hr de la incubación en RPMI -EDTA (0.2 %) a 4°C usando la goma de una jeringa. Esta población contenía más de 80% de células CD14+, determinado por citofluorometría. Se eliminó a los macrófagos de las células no adherentes incubándolas con metil éster de leucina 5 mM, pH 7.4 por 45 min a 25°C, y lavando 2 veces con PBS. A partir de las células no-adherentes se aislaron las células T y B mediante roseteo con eritrocitos de camero (EC) tratados con 2-bromuro de aminoetilisotiouronio (AET)^{12,64}. Las células que se adhirieron a los EC-AET (L-T) fueron en promedio 95% células CD3+. Las células no-adherentes fueron CD19+ en más de un 90%. Una parte de las células así obtenidas se congeló a -70°C y la otra se cultivó a 37°C durante 24 horas a razón de 1 millón de células por ml en RPMI.

V. ENSAYO FUNCIONAL DE INTERLEUQUINA-10.

Se llevó a cabo a partir de células no-T a una concentración de 1 millón de células por ml. Se cultivaron en RPMI-suero bovino fetal (SBF) al 10% durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se lavaron 3 veces con RPMI-SBF al 10%, se midió la viabilidad de cada uno de los tubos con azul tripán (0.04%, en PBS). Se añadió a un tubo, anticuerpos anti-IL-10 (10 µg/ml) (donado por el Dr Dominique Emilie del Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, INSERM, Francia); a otro, sólo RPMI-SBF-10%; y a un tercer tubo, IL-10 recombinante (DNAX, Palo Alto, CA) a una concentración de 25 ng/ml. Todos los tubos se incubaron durante 5 días a 37°C. Se midió la viabilidad celular y se recogieron los sobrenadantes para hacer el estudio de producción de inmunoglobulinas.

VI. ENSAYOS DE ELISA PARA INTERLEUQUINA-10 E INTERLEUQUINA-13.

Los niveles de IL-10 se midieron en los sobrenadantes de los cultivos celulares de 24 h mediante un ensayo de ELISA de doble sandwich usando un kit comercial (Innotest, Besancon, Francia). La sensibilidad de este ensayo es de 3 pg/ml y no reconoce el producto del gen BCRF1 del virus de Epstein-Barr. Los niveles de IL-13 en estos mismos sobrenadantes se midieron también por ELISA. Como primer anticuerpo se usó el Ac monoclonal B-B13 (donado por el Dr Dominique Emilie, INSERM, Francia) a razón de 7.5 µg/ml en PBS a 4°C. La placa se lavó 4 veces con PBS, se incubó (250 µl/pozo) por 2 h a temperatura ambiente en un amortiguador de bloqueo (sacarosa 20%

en 0.1M Tris, pH 7.7), se eliminó éste y después se añadieron 100 µl de los estándares y de las muestras diluidas en un amortiguador de la muestra (PBS, 1% suero bovino fetal, 3% de suero normal de ratón, 0.1% thimerosal). Las muestras se incubaron por 2 h a 37°C. Se lavaron los pozos 4 veces, y se añadieron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa (SIGMA) (1 mg/ml en amortiguador de muestra) a cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente por 45 min. Se lavaron los pozos 4 veces y se añadió a cada pozo 100 µl de dihidroxicloruro de o-fenilenediamina (0.4 mg/ml, SIGMA), y se incubaron a 20°C por 30 min. Se detuvo la reacción al añadir H₂SO₄ 1N (100 µl/pozo). La absorbancia de los pozos se midió a 492 nm.

VII. ENSAYOS DE ELISA PARA INMUNOGLOBULINAS IgM E IgA TOTALES.

Las placas se sensibilizaron con Ac policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas humanas conjugado con peroxidasa (10 µg/ml, diluidos en amortiguador de carbonatos), incubadas por 12 horas a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05%, se bloquearon con PBS-albúmina sérica bovina 1% por 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05%. Posteriormente se incubaron por 2 h los sobrenadantes diluidos 1:2 en PBS-SBF 10%, a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces. Posteriormente se puso el segundo anticuerpo (anti-IgM o anti-IgA marcados con fosfatasa alcalina), se incubó por una h a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces y se incubaron las placas a 37°C con el sustrato de la fosfatasa alcalina en

amortiguador de dietanolamina, pH 9.8. A los 45 minutos se midió la absorbancia de los pozos a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro Titertek.

VIII. OBTENCIÓN Y ESTIMACIÓN SEMICUANTITATIVA DEL RNA^{68,69}.

El RNA total se obtuvo a partir de 5 hasta 10 millones de células, así como de las biopsias de glándula salival congeladas a -70°C, utilizando la técnica de Trizol de acuerdo a las recomendaciones del productor (Gibco-BRL). Se homogeneizaron en Trizol, el tejido y las células, a razón de 0.1 ml de Trizol por cada millón de células y 1 ml de Trizol por cada biopsia. Se añadieron 0.1 volúmenes de cloroformo por cada volumen del tejido homogeneizado. Se mezcló vigorosamente durante 15 seg. Se incubaron 5 min a 4°C, se centrifugaron por 15 min a 12,000 g a 4°C. La fase superior se transfirió a otro tubo y se añadió a éste un volumen de isopropanol, se mezcló y se dejó 15 min en hielo. Se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con etanol al 75%. El RNA así extraído fue tratado con 10 unidades de DNAasa-I libre de RNAasas (Gibco) a 37°C por 30 min, para posteriormente extraerlo con fenol, cloroformo-alcohol isoamílico, y precipitarlo con etanol. El RNA obtenido se cuantificó mediante un kit comercial (Fast-check, Gibco, BRL, Gaithersburg, MD) en el cual la muestra se fijó a una tira de papel, se incubó con un complejo de fosfatasa alcalina modificado químicamente que se une específicamente a ácidos nucleicos. Posteriormente el complejo se detectó por

colorimetría y se comparo con un estándar (la sensibilidad del sistema es de 10 pg a 1 ng de RNA).

Se sintetizó cDNA utilizando 1 μ g de RNA que se incubó con 50 U de transcriptasa reversa del virus Moloney de leucemia (Gibco-BRL), en presencia de 2.5 μ M de oligo-d(T)₁₂₋₁₈ (Gibco-BRL) y 0.5 mM de cada uno de los cuatro deoxinucleótido-trifosfatos. El cDNA resultante se dividió en 8 alícuotas en los estudios con linfocitos T purificados, y en 4 alícuotas para los ensayos con células mononucleares de sangre periférica y con glándulas salivales. Para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se añadió a cada una de las alícuotas, 3 μ M de cada iniciador sentido y antisentido (tabla 1), y 2 unidades de Taq polimerasa (Perkin-Elmer). La amplificación del cDNA de los linfocitos T se llevó a cabo por 28 ciclos de 94°C (un min), 55°C (un min) y 72°C (un min). La amplificación del cDNA de las células mononucleares totales fue de 33 ciclos de 94°C (un min), 53°C (un min) y de 72°C (1.5 min).

TABLA I.

Oligonucleótidos utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa:

	sentido		antisentido		tamaño (pb)
	5'	3'	5'	3'	
β-actina	GGGTCAGAAGGATTCCTATG		GGTCTCAAACATGATCTGGG		237
β2μglob	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC		GATGCTGCTTACATGTCTCG		268
IL-2r	GTGAAATGGAGACCAGTCAG		TCTACTCTCCTCTGTCCTC		250
IL-2	GTCACAAACAGTCGACCTAC		ATGGTTGCTGTCTCATCAGC		352
IL-4	TGCCTCCAAGAACACAACCTG		AACGTACTCTGGTTGGCTTC		224
IL-10	AAATTGGTTCTAGCCGGG		GAGTACAGGGGCATGATATC		264
IL-13	GAGTGTGTTTGTACCGTTG		TACTCGTTGGCTGAGAGCTG		253
IFN-γ	GCAGAGCCAAATTGTCTCCT		ATGCTCTTCGACCTCGAAAC		290

Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.9% con 0.25 μ g/ml de bromuro de etidio. Todas las muestras se corrieron paralelamente a los controles positivos (β 2- μ globulina o β -actina). Los controles negativos fueron, en la reacción de transcriptasa reversa, muestras en donde se omitió la transcriptasa reversa, y para las reacciones de PCR, se omitió incluir cDNA. Los geles se fotografiaron con un filme Polaroid (tipo 665), y los negativos se usaron para el análisis densitométrico. Se midió la intensidad de las bandas y todos los valores se normalizaron a un valor de 1 a los del control positivo incluido en cada amplificación.

IX. SOUTHERN BLOT.

El oligo interno de IL-10 (5'CATCGATTTCTTCCCTGTGA3') y el de IL-13 (5'TGGGGAAGACTGTGGCT3') se marcaron con digitonina-dUTP de la siguiente manera: se incubaron por 30 min a 37°C 4 µl del "tailing buffer" (5X), 4 µl de cloruro de cobalto, 1 µl de digitonina-dUTP, 25 unidades de transferasa terminal, 50 pMol del oligo interno y H₂O para un volumen final de 20 µl. Transcurridos 30 minutos se colocó la mezcla en hielo. Para parar la reacción se añadieron 2 µl de glicógeno diluido 1:200 en EDTA-Na 0.2M. La sonda se precipitó con 2.5µl de LiCl 4M y 75 µl de etanol al 100%. Se mezcló bien y se incubó por 30 minutos a 4°C. Se centrifugó por 15 min a 12,000 g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%, después de centrifugar por 15 min a 12,000 g a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se secó al vacío. El oligo se resuspendió en 50 µl de H₂O.

Se prehibridizó una membrana de nylon con 20 ml de amortiguador de hibridación [solución SSPE 6X (solución SSPE: NaCl 150 mM, Na₂PO₄ 10mM, EDTA-Na 1mM, pH 7.4), SDS 0.5%, y solución Denhardt 5X (Sigma) que contenía 0.5 mg de esperma de salmón previamente hervido y enfriado, por una hora a 42°C. Posteriormente se hibridó la membrana con amortiguador de hibridación y 50 µl del oligo marcado con digitonina. Se lavó 2 veces la membrana con solución SSC 5X por 15 min, y 2 veces en solución SSPE 6X-SDS 1%, por 10 min a temperatura T_d [T_d : (G + C X 4) + (A + T X 2)] (T_d para IL-10 = 46°C; y para IL-13 = 27°C). Se secó la

membrana entre papel filtro y se guardó a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con amortiguador de lavado [amortiguador 1 (ácido maléico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) y 0.3% de Tween 20] por 5 min con agitación a temperatura ambiente. Después se incubó por 30 min en el amortiguador 2 [amortiguador 1 y 10% se solución de bloqueo (Boering). Después se incubó con el conjugado anti-digtonina-AP diluido 1:5000 en el amortiguador 2 por 30 min, se lavó con el amortiguador de lavado 2 veces por 15 min, y se equilibró en el amortiguador 3 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5) por 5 minutos. Se incubó con Luminigen PPD (Boehringer) diluido 1:100 en el amortiguador 3 por 5 min. Se secó en papel filtro y envolvió en EGA-PACK, y se incubó 20 min a 37°C. Se colocó en un cartucho de rayos X durante 20 min y finalmente se reveló por autorradiografía.

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizaron pruebas no-paramétricas (prueba U de Mann-Whitney) para comparar los valores de los pacientes con los de los controles. También se realizó correlación lineal de Pearson y regresión logística para relacionar las variables entre sí.

RESULTADOS

I. ANÁLISIS DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES Y CONTROLES.

Para determinar las anomalías en las subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de los pacientes con síndrome de Sjögren primario, se realizaron tinciones con diferentes anticuerpos monoclonales. Los datos obtenidos se muestran en las tablas II y III.

TABLA II.

Subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica en pacientes con síndrome de Sjögren primario y en sujetos sanos. Los valores muestran el porcentaje respecto a linfocitos totales.

Maicador de superficie	SSP n=17	Controles n=11	p
CD2	72.2 (8.9)*	66.0 (20.2)	NS**
CD3	64.2 (10.6)	65.1 (11.5)	NS
CD4	36.8 (5.1)	44.3 (10.2)	0.027
CD14	1.2 (1.0)	1.0 (0.9)	NS
CD19	14.7 (6.5)	11.6 (3.4)	NS
CD45	94.7 (7.6)	93.7 (8.5)	NS
CD56	14.7 (7.2)	12.4 (6.7)	NS
CD3/CD8	26.1 (6.5)	20.4 (6.5)	0.068
CD19/CD5	5.5 (4.0)	3.4 (2.2)	NS
CD4/CD25	10.5 (7.9)	4.5 (2.2)	0.005
CD8/CD25	1.7 (4.6)	0.2 (0.18)	0.025

*Porcentaje \pm desviación estándar de linfocitos. ** NS, no significativo por U de Mann-Whitney.

TABLA III.

Número absoluto de linfocitos por ml de sangre periférica en pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren primario y en controles.

Marcador de superficie	SSP n=17	Controles n=11	p
CD2	978 (551)	1283 (577)	NS
CD3	868 (503)	1199 (454)	0.043
CD4	500 (263)	886 (410)	0.03
CD14	14 (13)	22 (22)	NS
CD19	215 (172)	215 (85)	NS
CD45	1313 (733)	1748 (629)	NS
CD56	213 (144)	224 (130)	NS
CD3/CD8	348 (191)	351 (100)	NS
CD19/CD5	89 (89)	61 (42)	NS
CD4/CD25	117 (85)	100 (78)	NS
CD8/CD25	25 (64)	4 (3)	0.045

*Número de linfocitos (\pm desviación estándar) por ml de sangre periférica. **NS, no significativo, U de Mann-Whitney.

Los linfocitos CD4+ se encontraron disminuidos, tanto en proporción como en números absolutos en los pacientes con síndrome de Sjögren primario en comparación con los controles ($p = 0.027$ y 0.03 , respectivamente). Además, las células CD4+ de los pacientes expresaron en mayor proporción el receptor de baja afinidad de interleuquina-2 (CD25) que los controles ($p = 0.005$). La figura 2 muestra los datos obtenidos en un paciente y un control. El porcentaje de linfocitos de sangre periférica que expresaron tanto al antígeno CD3 como el CD8 fue mayor en los pacientes que en los controles ($p=0.068$). Asimismo, los linfocitos CD8+CD25+ también se encontraron incrementados, tanto en porcentaje como en números absolutos en los pacientes en comparación con los controles sanos. La relación de células CD4+/CD8+ fue de 1.51 en los pacientes y de 2.54 en los controles ($p = 0.02$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles con respecto a los otros antígenos estudiados.

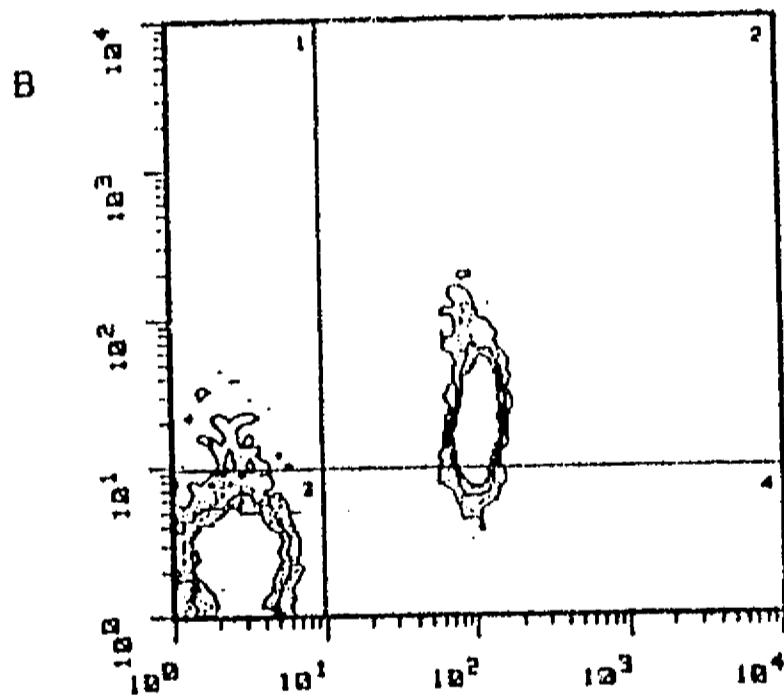
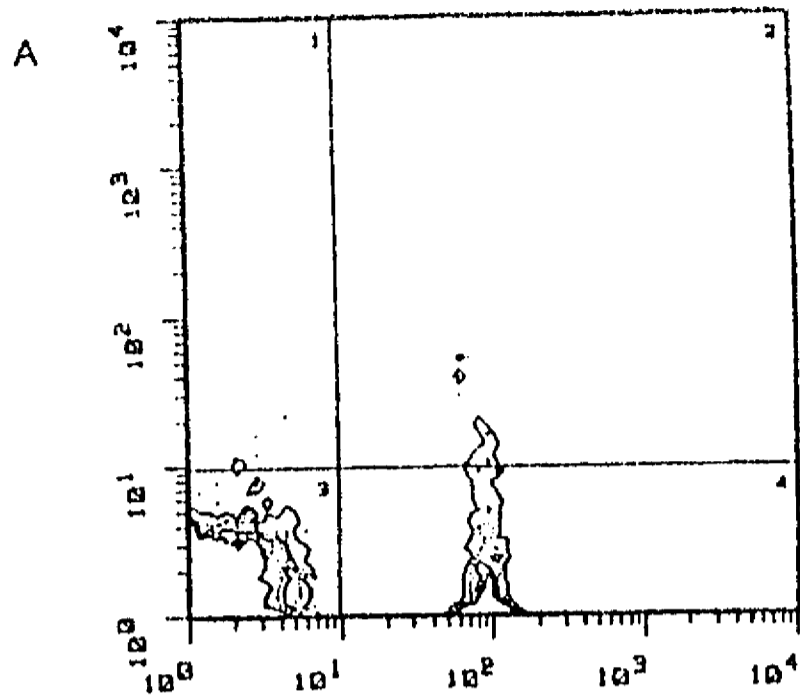


Figura 2. Citofluorometría de linfocitos marcados con anti-CD4 y anti-CD25. A: control sano. B: paciente con síndrome de Sjögren primario. Eje de las abscisas (x): CD4; eje de las ordenadas (y): CD25.

II. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE CITOCINAS POR LINFOCITOS T.

Los datos mencionados en la sección anterior sugieren que los linfocitos T de los pacientes con SSP se encuentran previamente activados *in vivo*. Por esto se estudió la expresión de citocinas por los linfocitos T. Se midió la producción espontánea de RNAm de citocinas en 7 pacientes seleccionados de manera aleatoria y en 5 controles sanos. Se determinó en cada muestra la relación entre las intensidades de las bandas entre los productos de la reacción de transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa de las citocinas y la β_2 - μ globulina. Los resultados se muestran en la Tabla IV.

De los 7 pacientes analizados, 5 mostraron expresión de RNAm de IFN- γ y de IL-10, y 4 de éstos de IL-13. Hubo 2 pacientes cuyos linfocitos T expresaron simultáneamente RNAm de IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- γ . Dos pacientes fueron positivos para todas las citocinas estudiadas y otros 2 fueron negativos para ellas. Cinco de los 7 pacientes con SSP fueron positivos para la cadena α del receptor de interleuquina-2 (p55). En 4 de los 5 controles sanos estudiados, no se encontró expresión de RNAm para ninguna de las citocinas estudiadas ni para p55, mientras uno de ellos fue positivo para p55 y para IFN- γ . Como grupo, los pacientes con SSP expresaron más la cadena α del receptor de IL-2 que los controles ($p = 0.069$) y más IL-10 ($p = 0.039$). La figura 3 muestra los productos de la amplificación por PCR de un paciente y un control.

TABLA IV.

Expresión de los genes del receptor de IL-2 (p55) y de citocinas por linfocitos T de sangre periférica en pacientes con síndrome de Sjögren primario y controles.

	p55	IL-2	IL-4	IL-10	IL-13	IFN- γ
Paciente SRG	0.31*	0.00	0.00	0.41	0.00	0.53
Paciente PGL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Paciente YMP	0.26	0.17	0.18	0.27	0.20	0.64
Paciente ACO	0.53	0.09	0.21	0.52	0.35	0.53
Paciente CFG	0.38	0.06	0.00	0.09	0.23	0.29
Paciente IS	0.17	0.00	0.00	0.29	0.16	0.20
Paciente SGH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Control 1	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.47
Control 2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Control 3	0.00	0.00	0.00	ND	0.00	0.00
Control 4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Control 5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.001	0.00

ND, no determinado. * Los valores representan los índices β_2 -microglobulina/citocina obtenidos por densitometría del negativo de los geles.



Figura 3. Expresión de citocinas y de p55 por linfocitos T de sangre periférica de un paciente con síndrome de Sjögren primario y de un control. Se utilizó transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el RNAm que codifica para la cadena α del receptor de IL-2 (p55), IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- γ . Se muestran los resultados representativos de los geles teñidos con bromuro de etidio de un paciente y de un control sano. Carriles 1 a 7: β 2-microglobulina, p55, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- γ amplificados de un paciente con SSP. Carriles 8 a 14: β 2-microglobulina, p55, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- γ amplificados de un control sano.

Para corroborar que las reacciones de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa se encontraban en la fase exponencial de la amplificación, se midieron las intensidades de las bandas de los productos de la amplificación del RNAm de la β_2 -microglobulina de la muestra sin diluir de RNA, y de diluciones crecientes de la misma muestra en aquellos pacientes que fueron positivos para IL-10, IL-13 e IFN- γ . Se muestra un experimento representativo en la figura 4. Se puede ver que la disminución de la concentración de RNAm de las citocinas es concomitante a la disminución en la relación β_2 -microglobulina/citocina, y que ésta tiene una relación directa a la concentración del RNAm de la citocina.

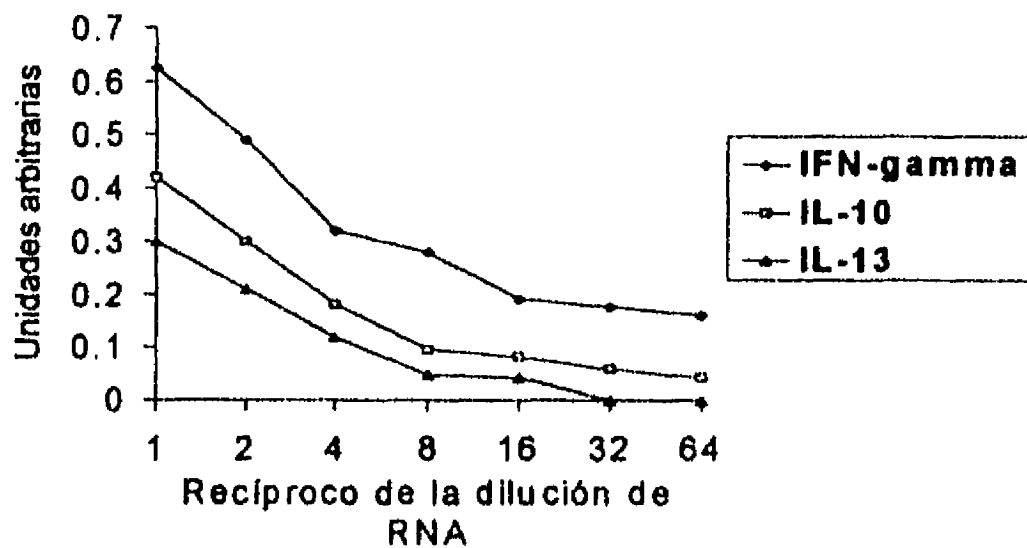


Figura 4. Las reacciones de reacción en cadena de la polimerasa se encontraban en la fase exponencial de la amplificación. Se realizaron diluciones crecientes del RNA de 3 pacientes para amplificar IL-10, IL-13 e IFN- γ . Unidades arbitrarias: relación β_2 -microglobulina/citocina. Se observó que a mayor dilución del RNA, la relación β_2 -microglobulina/citocina disminuyó de manera dosis-dependiente. Se muestran los resultados obtenidos en un paciente.

III. EXPRESIÓN DE INTERLEUQUINA-10 E INTERLEUQUINA-13 POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

Se estudió la expresión de los genes de IL-10 e IL-13 en 12 pacientes y en 12 controles, mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa. Todos los pacientes estudiados dieron señal positiva para IL-10. La especificidad de la señal para IL-10 se corroboró mediante la hibridación del producto con un oligonucleótido interno marcado con biotina (datos no mostrados). Se detectó una banda muy débil (apenas visible, pero no detectable por el densitómetro), correspondiente al tamaño de 253 pares de bases de IL-13 en 10 pacientes y 8 controles. Tanto en los 12 controles como en los 12 pacientes con SSP se detectó el producto amplificado de la β -actina. El análisis cuantitativo de la expresión de IL-13 por CMN de sangre periférica no mostró diferencias entre los pacientes y los controles (no se muestran los datos).

La mayor expresión del gen de IL-10 se asoció a la producción paralela de IL-10. Las células mononucleares de sangre periférica de 20 pacientes con SSP y de 15 controles se cultivaron durante 24 horas. Los pacientes con síndrome de Sjögren primario secretaron en promedio 4.88 ng, y los controles 91.9 pg de IL-10. La concentración de IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos fue en promedio 52 veces mayor en las muestras de los pacientes en comparación a las de los controles (figura 5). La diferencia entre pacientes y controles, fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

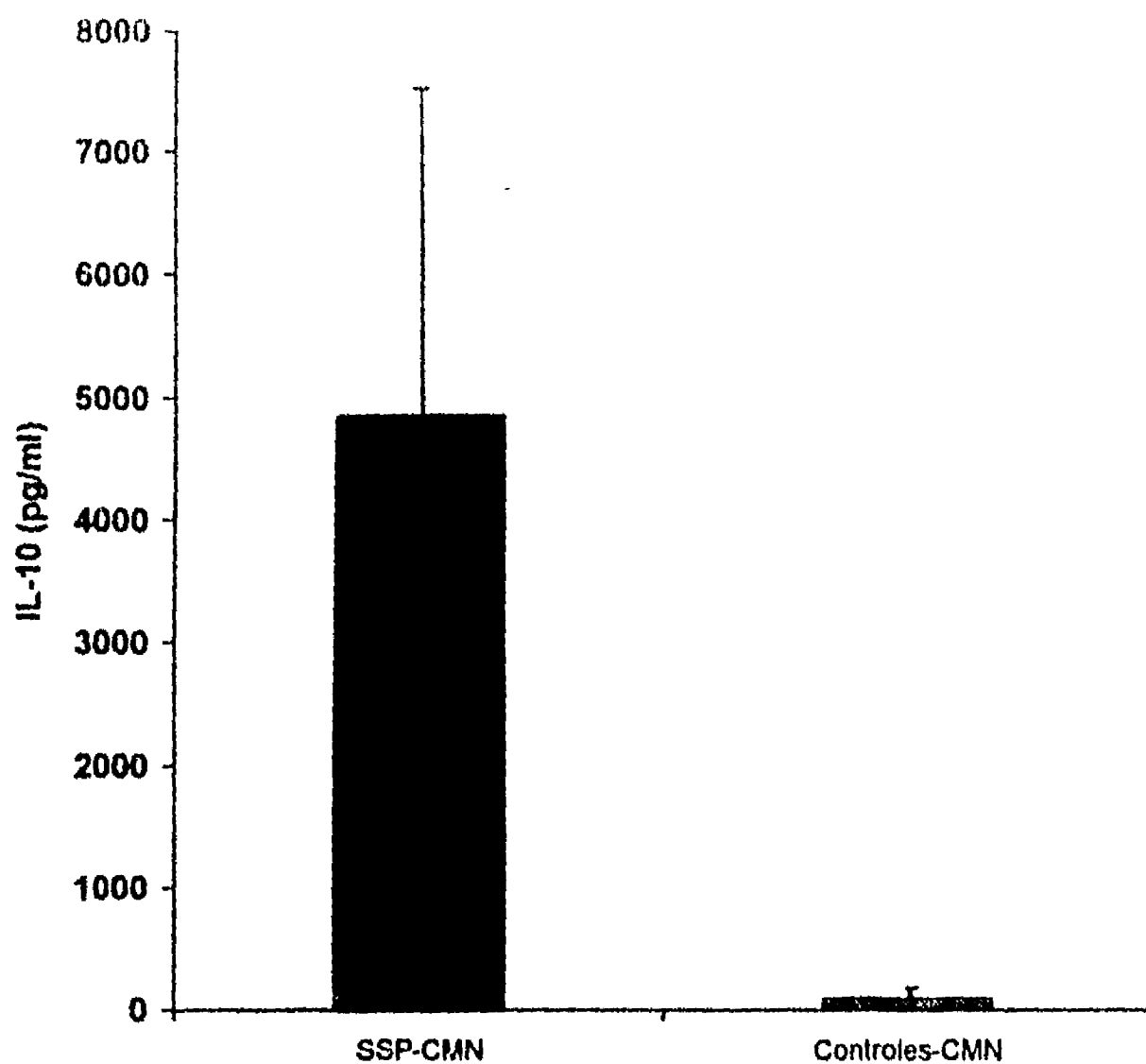


Figura 5. Producción de IL-10 por células mononucleares de sangre periférica de 19 pacientes con síndrome de Sjögren primario y 15 controles. Las células mononucleares de los pacientes secretaron un promedio de 4855.8 ± 2960.6 pg, y los controles 91.9 ± 103.4 pg de IL-10 al medio en cultivos de 24 hr. Los pacientes secretaron un promedio de 52 veces más IL-10 que los controles sanos.

Debido a la presencia de niveles apenas detectables de la expresión del gen de IL-13, tanto en pacientes como en controles, se estudió también la

secreción de IL-13 en los sobrenadantes de los cultivos de 24 horas de células mononucleares de sangre periférica. De los 12 pacientes estudiados, sólo 3 secretaron niveles de IL-13 por arriba del límite de sensibilidad del ensayo (62, 52 y 37 pg/ml, respectivamente) (figura 6).

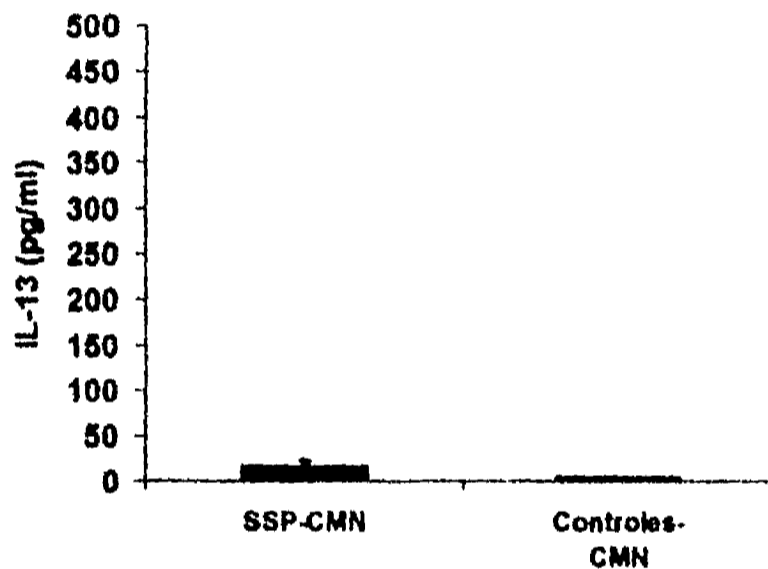


Figura 6. Producción de IL-13 por células mononucleares de sangre periférica en pacientes con síndrome de Sjögren primario y controles sanos. De los 12 pacientes estudiados, sólo 3 produjeron niveles detectables de IL-13 (paciente BSG: 62, paciente NEB: 52, paciente ACO: 37 pg/ml, respectivamente). En uno de ellos (ACO), los linfocitos T parecerían ser los responsables de esta producción. Los otros 2 pacientes positivos para IL-13 presentaban linfopenia al momento del estudio, por lo que no se pudieron separar cantidades suficientes de linfocitos para hacer el estudio de las subpoblaciones. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre pacientes y controles, por análisis de chi-cuadrada, prueba exacta de Fisher.

Para determinar cuál(es) subpoblación(es) de células mononucleares en sangre periférica son responsables del incremento en la producción de IL-10 en los sujetos estudiados, se aislaron las subpoblaciones celulares de 14 pacientes, y se midió la producción espontánea de IL-10 por ELISA. Se encontró que los monocitos y las células B fueron responsables del 89% de la producción de IL-10 mientras que las células T sólo del 11% de ella (figura 7).

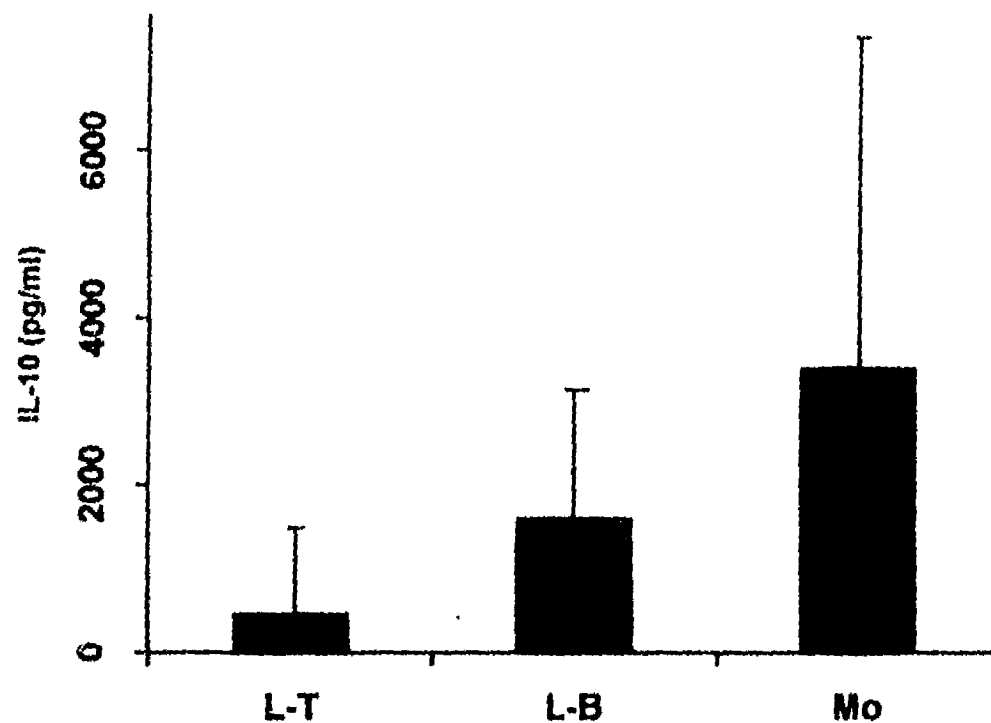


Figura 7. Secreción de IL-10 por linfocitos T, células B y monocitos (Mo) de sangre periférica en 19 pacientes con síndrome de Sjögren primario. Los linfocitos T secretaron un promedio de 446 ± 1278 pg, las células B 1593 ± 1704 pg y los monocitos 3391 ± 4590.8 pg de IL-10 a los sobrenadantes de los cultivos. Las células B contribuyeron con el 39.3% y los monocitos con el 49.7% del total. En conjunto, las células B y los monocitos fueron responsables del 89% de la producción de IL-10.

IV. EFECTOS *IN VITRO* DE IL-10 Y DE ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-IL-10 SOBRE LA SÍNTESIS DE INMUNOGLOBULINAS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO.

Para conocer si la producción endógena de IL-10 contribuye a la hiperactividad espontánea de los L-B observada en los pacientes con SSP, se llevaron a cabo experimentos con células no-T en dos pacientes. Estas células se cultivaron por 24 h en medio completo, se lavaron, y se cultivaron por 5 días más, en medio completo solo, en presencia de anti-IL-10 o bien de IL-10 recombinante. Al final del cultivo, se midió la concentración de IgA e IgM en los sobrenadantes.

La figura 8 muestra los resultados obtenidos en ambos pacientes. En la paciente AMG la adición de anti-IL10 disminuyó la secreción de IgA en más del 40%, y en cambio, al añadir IL-10 recombinante, la producción de IgA fue semejante al control. En esta paciente, la producción espontánea de IgM disminuyó en un 95% respecto a los niveles basales cuando se añadió el Acm anti-IL-10 tanto desde el primer día de cultivo como durante los 6 días de cultivo (datos no mostrados). En la paciente ARV, la presencia de IL-10 recombinante aumentó la producción de IgA por las células no-T en un 40.8% respecto al control, y en cambio al añadir anticuerpo monoclonal anti-IL-10 la producción de IgA disminuyó en un 46% respecto al control. Cabe decir, que también se realizaron experimentos con IL-13. Estos no fueron tan claros, ya que la adición de IL-13 al medio de cultivo no modificó la producción de inmunoglobulinas en los dos pacientes

estudiados (datos no mostrados) , y no contamos con el Acn anti-IL-13 para la realización de estos estudios.

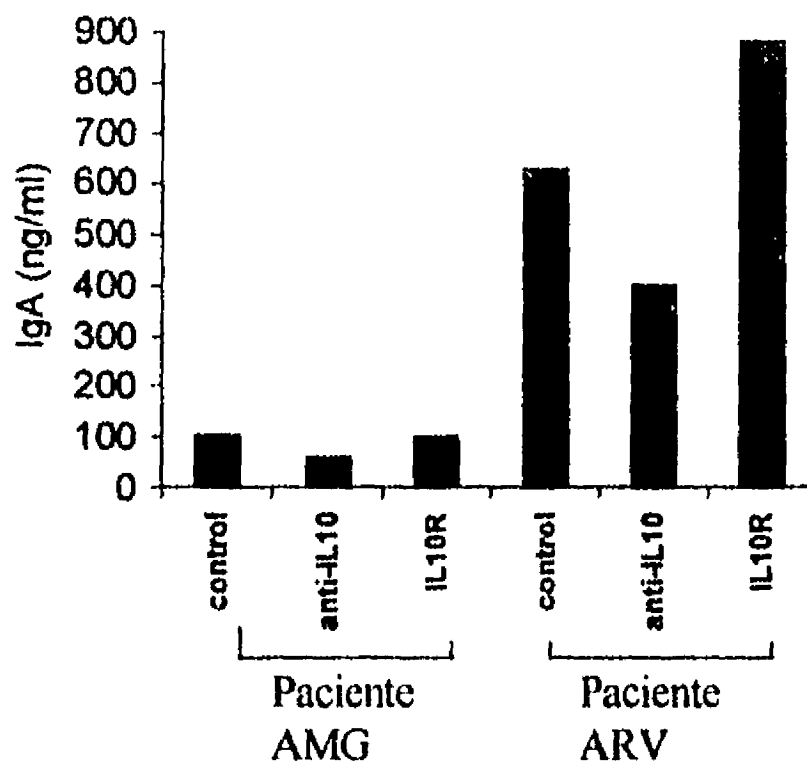


Figura 8. Relación entre secreción de IgA e IL-10 en 2 pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren primario. Las células no-T de las pacientes AMG y ARV secretaron espontáneamente 104 y 625 ng de IgA después de 6 días en medio de cultivo. Al añadir a las 24 horas de iniciados los cultivos, 10 μ g/ml de anticuerpo monoclonal anti-IL-10, disminuyó a 60 y 400 ng respectivamente. La producción de IgA fue de 100 y 880 ng respectivamente cuando se añadió IL-10 recombinante a los cultivos de ambos pacientes.

V. CORRELACION ENTRE LA PRODUCCION DE IL-10 Y LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.

Se buscó una relación entre la producción de IL10 por células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren primario y de los controles sanos, con la proporción de los distintos subgrupos de linfocitos de sangre periférica. Se observó mediante correlación de Pearson una relación entre IL-10 en sobrenadantes de células mononucleares de sangre periférica y proporción de linfocitos CD3/CD8, con un valor de r de 0.50 ($p < 0.01$), también se relacionó con la proporción de linfocitos CD4+/CD25+ ($r = 0.77$, $p < 0.001$) (figura 9), e inversamente con la relación proporcional CD4+/CD8+ ($r = -0.55$, $p < 0.01$). Ninguna otra de las subpoblaciones linfocitarias se relacionó de modo significativo con la producción de IL-10 de los sobrenadantes de las células mononucleares totales o de los linfocitos T, B o monocitos.

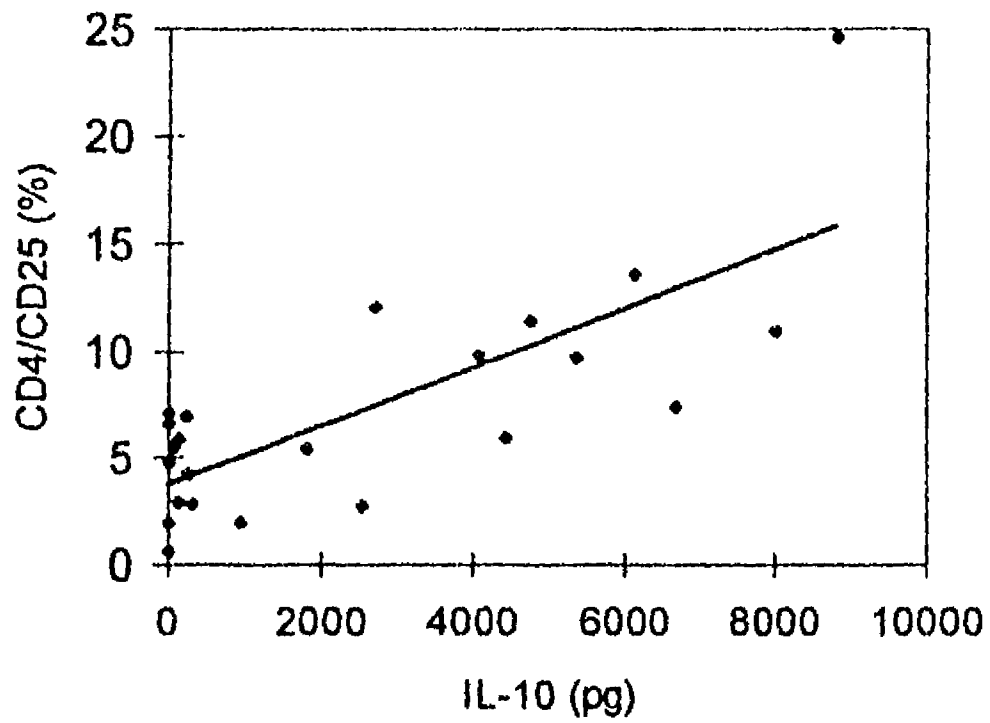


Figura 9. Relación lineal entre secreción de interleuquina-10 por células mononucleares de sangre periférica y porcentaje de células T CD4/CD25+ en pacientes y controles. Valor de $r = 0.77$, $p < 0.001$.

Además, se analizó la relación entre la presencia de IL-10 en los sobrenadantes y la actividad policlonal de los linfocitos B (que en este trabajo consideramos como presencia de hipergammaglobulinemia, ya sea de IgG, y/o IgM y/o IgA; y/o presencia de factor reumatoide y/o inmunofluorescencia positiva) mediante regresión logística. Se observó una tendencia en la correlación, siendo la IL-10 un factor de riesgo para la actividad policlonal de linfocitos B ($p = 0.12$).

VI. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE IL-10 E IL-13 POR GLÁNDULAS SALIVALES.

Mediante estudios de estimación semicuantitativa mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa, se evaluó la expresión espontánea de los genes de IL-10 y de IL-13 por glándula salival en 7 pacientes con diagnóstico de SSP. Este análisis se llevó a cabo en paralelo en glándulas salivales de 3 controles. Después de la amplificación se observó una banda fuerte en correspondiente al tamaño de IL-10 en las glándulas de los 7 pacientes estudiados, y de igual manera se detectó IL-13 en 5 de ellos. Se detectó una banda débil de IL-10 en uno de los controles y en ninguno de ellos se detectó IL-13 (Tabla V). La figura 10 muestra un experimento representativo.

Las reacciones de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa se encontraban en la fase exponencial de la amplificación, y se muestra un experimento representativo en la figura 11.

TABLA V.

Estimación semicuantitativa de los niveles de expresión de los genes de IL-10 e IL-13 en glándula salival en pacientes y controles.

	IL-10	IL-13
Paciente IS	0.27*	0.28
Paciente FRA	0.77	0.30
Paciente JQF	0.30	0.30
Paciente MMM	1.00	1.08
Paciente NEB	1.06	0.00
Paciente YMP	1.13	0.59
Paciente AYI	0.30	0.00
Control 8	0.17	0.00
Control 9	0.00	0.00
Control 10	0.00	0.00

* Los valores representan los índices β -actina/citocina obtenidos mediante densitometría del negativo de los geles.

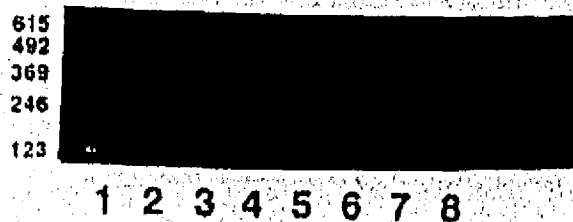


Figura 11. Amplificación de IL-10 e IL-13 en biopsias de glándula salival menor en pacientes con síndrome de Sjögren primario. Se utilizó transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el RNAm que codifica para IL-10, IL-13 y β -actina de biopsias de glándula salival de 7 pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren primario y de 3 controles. Se muestra el negativo de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio de un paciente y de un control sano. Carril 1: marcadores de tamaño (pb), carriles 2 a 4: β -actina, IL-10 e IL-13 amplificados de un paciente con SSP. Carriles 5 a 7: β -actina, IL-10, IL-13 amplificados de un control. Carril 8: control negativo.

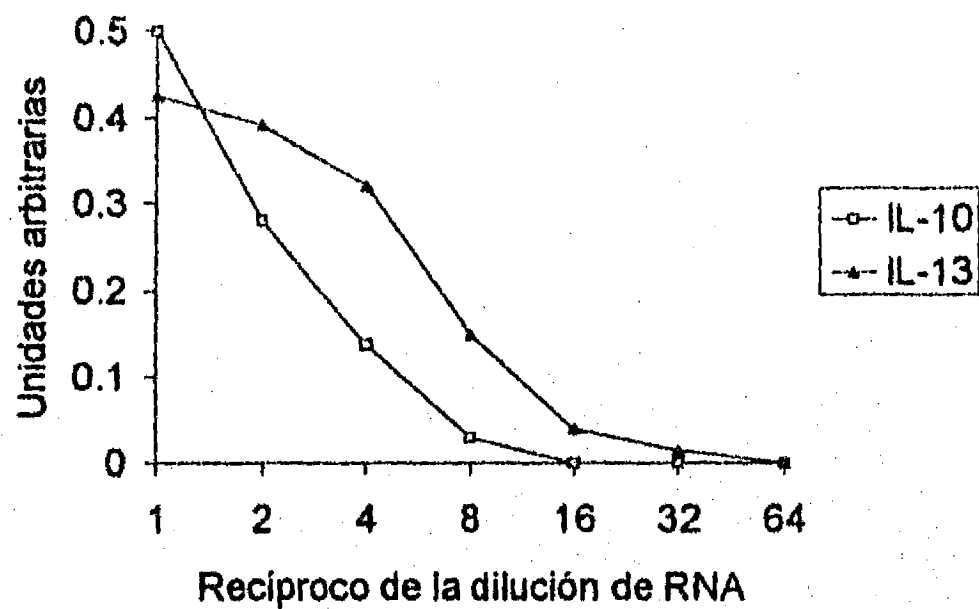


Figura 12. Las reacciones de reacción en cadena de la polimerasa se encontraban en la fase exponencial de la amplificación. Se realizaron diluciones crecientes del RNA para amplificar IL-10 e IL-13. Unidades arbitrarias: relación β -actina/citocina. Se observó que a mayor dilución del RNA, la relación β -actina-citocina disminuyó de manera dosis-dependiente. Se muestran los resultados de un experimento representativo obtenidos en un paciente.

DISCUSIÓN.

Distintos estudios han mostrado anomalías en las subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica de pacientes con síndrome de Sjögren primario. En este estudio se confirma la disminución de linfocitos T CD4⁺^{5,58,78}. También encontramos un incremento en la subpoblación de L-T CD8⁺. El mecanismo responsable de la disminución de L-T de ayuda y del incremento de L-T supresores no se conoce. Esto podría ser el resultado de la redistribución de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ desde sangre periférica hacia los tejidos, como se ha descrito en pacientes con escleroderma⁹⁹. Ambas subpoblaciones de linfocitos presentaron un incremento en la expresión del antígeno CD25. Dado que esto refleja activación de linfocitos T, el siguiente objetivo fue estudiar la expresión de los RNAm de citocinas derivadas de L-T activados, tanto en pacientes como en controles. Uno de los hallazgos importantes fue la sobreexpresión espontánea del gen de IFN- γ en L-T de los pacientes con síndrome de Sjögren primario. Estudios previos han demostrado la producción de IFN- γ por células T de sujetos sanos solamente después de estimulación previa *in vitro* ^{36,49,102}. La ausencia de IFN- γ en controles sanos es consistente con estos estudios. Por ello, la presencia de IFN- γ en L-T de pacientes con síndrome de Sjögren primario sugiere que las células han sido previamente activadas *in vivo*. Los pacientes con SSP presentan

infiltración y proliferación de L-T en las glándulas salivales, por lo tanto, la activación de L-T podría ocurrir en este sitio y las células activadas podrían entrar en la circulación vía el sistema linfático y los ganglios linfáticos o bien directamente de las glándulas salivales afectadas. También se ha documentado la expresión de RNAm de IFN- γ en pacientes con artritis reumatoide, patología en la que también se ha postulado la contribución de linfocitos T activados en la patogénesis de la enfermedad⁷⁹. Asimismo, se ha reportado la expresión espontánea de IFN- γ por células mononucleares y linfocitos T de sangre periférica y de líquido sinovial y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide¹³⁰. El control principal de la proliferación de los linfocitos T reside en el número de interacciones productivas del receptor de IL-2 con IL-2, que se realiza principalmente a través del control de la expresión en la superficie celular de la cadena α (CD25) de dicho receptor. Los factores que regulan la transcripción de esta cadena son varios, e incluyen a la IL-2, al TNF- α y al IFN- γ ¹¹⁴. Los datos de este trabajo sugieren que la producción de IFN- γ (por vía endógena o exógena) juega un papel importante en el control de la proliferación de las células T de los pacientes con SSP, y que la inducción del receptor de IL-2 pudiera ser el mecanismo mediante el cual el IFN- γ induce la activación de las células T. Estos cambios al nivel de RNAm se reflejan en la superficie celular, tanto en las subpoblaciones de células T de ayuda (CD4+) como en las T supresoras (CD8+).

La proporción de linfocitos T de ayuda que expresan CD25 y de L-T supresores se correlacionó linealmente de modo significativo con la secreción espontánea de IL-10 por células mononucleares de sangre periférica. Ninguna otra población celular estudiada se relacionó con la secreción de IL-10. La correlación encontrada entre linfocitos T CD4+/CD25+ y presencia de interleuquina-10 en los sobrenadantes de las

células mononucleares podría ser reflejo de la influencia, ya sea directa o indirecta, de la IL-10 en la expresión de CD25 por linfocitos T de ayuda, como se ha descrito en otros estudios⁶¹. Sin embargo son necesarios estudios funcionales en estos pacientes para corroborar esto. La relación de IL-10 con linfocitos CD3/CD8 podría indicar que la IL-10 contribuye, junto con otros estímulos (como la IL-2 y el IFN- γ) a la proliferación de linfocitos T supresores como ha sido reportado *in vitro*²²

Además, la expresión *in vivo* del gen de IL-10 por células mononucleares de sangre periférica fue mayor en pacientes con síndrome de Sjögren que en los individuos sanos. Estos resultados se obtuvieron al estudiar una población numerosa de pacientes con SSP y se hizo evidente mediante el estudio de la expresión de RNAm de células mononucleares de sangre periférica frescas, tanto mediante transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa como por ELISA.

Para determinar la subpoblación celular, que además de los linfocitos T contribuía a la producción de IL-10 en el síndrome de Sjögren primario, estudiamos la producción de IL-10 por las diferentes subpoblaciones. Los linfocitos T produjeron niveles detectables de IL-10. Sin embargo, la contribución de éstos a la producción total de IL-10 por células mononucleares fue de sólo el 11%. En todos los pacientes la mayor producción de IL-10 por células mononucleares fue dada por los linfocitos B y los monocitos.

En este sentido, el desbalance inmunológico observado en los pacientes con síndrome de Sjögren primario, i.e. hiperactividad de células B, podría estar privilegiado de tal modo que las células B fueran inducidas a diferenciarse por influencia de IL-10, con la resultante hipergammaglobulinemia y producción de auto-anticuerpos. De hecho, y de modo semejante a los hallazgos en lupus eritematoso generalizado⁷² y en

artritis reumatoide⁹⁰, en 2 pacientes con SSP, la adición de anticuerpo monoclonal anti-IL-10 a cultivos de linfocitos no-T de sangre periférica redujo considerablemente la secreción de inmunoglobulinas, y al añadir posteriormente IL-10 recombinante al medio de cultivo, esta producción de inmunoglobulinas se restableció a niveles semejantes al control. Los resultados aquí obtenidos apoyan la noción de un papel de IL-10 en la hiperactividad policlonal de los linfocitos B observada en los pacientes con síndrome de Sjögren primario.

Además, analizamos la expresión de IL-10 en glándulas salivales de 7 pacientes y de 3 controles sanos. Encontramos que todos los pacientes con síndrome de Sjögren primario fueron positivos a IL-10, esto en contraste con los niveles bajos o inexistentes encontrados en las biopsias controles. En un estudio previo, Fox *et al*⁴² encontraron mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, expresión de los RNAm de IL-2, IFN- γ y de IL-10 pero no de IL-4 ni IL-5 por las células T CD4+ de las glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren. En cambio, Boumba *et al*¹¹, con hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, encontraron RNAm de IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6 pero no de IL-10 en las células mononucleares que infiltran de las glándulas salivales de los pacientes con SSP. De hecho, encontraron RNAm de IL-4 en las células T CD45RA de pacientes con lesiones iniciales y moderadas. Estos resultados aparentemente contradictorios, se podrían explicar por los abordajes metodológicos diferentes usados por ambos estudios. Los dos estudios encontraron que las células epiteliales de las glándulas salivales producen citocinas pro-inflamatorias (IL-1 α , IL-6, TNF- α), lo cual sugiere que las células epiteliales también juegan un papel importante en la patogénesis de las lesiones observadas en los pacientes con SSP. En lo que se refiere a la expresión de RNAm de IL-10 los resultados de esta tesis apoyan el trabajo

de Fox; sin embargo, cabe recalcar que este trabajo se llevó a cabo con RNAm de extracto total de las biopsias de glándula salival y que el objetivo no fue determinar qué células eran las responsables de la producción de las citocinas estudiadas.

La presencia de IL-10 correlaciona con repuestas humorales, y la de IFN- γ con repuestas de hipersensibilidad retardada en humanos. La presencia de ambas citocinas en los pacientes con SSP es interesante, ya que ambas citocinas pueden ser antagónicas entre sí³⁰. Una posible explicación podría ser que IL-10 no inhibiera la síntesis de IFN- γ que resulta de activación de L-T_{H1} cuando las células presentadoras de antígeno no fueran los macrófagos sino los linfocitos B, como se ha descrito en otros estudios³⁰. También podría ser que la IL-10 presente no fuera suficiente para inhibir completamente la producción de IFN- γ , y de cualquier forma la IL-10 evitaría un daño más grave en los sitios afectados.

Se encontró expresión génica de IL-13 en las biopsias de glándula salival de 5 de 7 pacientes con SSP y en ninguno de los controles. Además de estimular la producción local de inmunoglobulinas^{77,84}, se conoce que IL-13 antagoniza la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 α/β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α y TNF- α) en respuesta a IFN- γ . Si tomamos en cuenta los trabajos de Fox y Boumba, mencionados previamente, puede verse que IL13 tampoco logra abatir completamente la producción de algunas de estas citocinas inflamatorias. Por otro lado, la IL-13 también podría estimular la síntesis de IFN- γ por los linfocitos infiltrantes, y junto con él incrementar la expresión de moléculas de clase II del sistema principal de histocompatibilidad en las células infiltrantes de las glándulas salivales menores, ya descritas en este padecimiento. Por lo tanto podría de esta manera, participar en la perpetuación del proceso autoinmune. Recientemente, se ha descrito que IL-13 induce

un aumento en la expresión de ICAM-1 y que participa en la regulación del proceso de migración de linfocitos⁶³. A pesar de que IL-13 participa en diferentes funciones e induce resultados diferentes en el sistema inmune, sus acciones biológicas *in vivo* en la homeostasis del sistema inmune aún no son bien conocidas.

Tanto IL-10 como IL-13 son activadores potentes de los linfocitos B; se sabe que IL-10 es una citocina importante en la hiperactividad de los linfocitos B y en el desarrollo de autoinmunidad, mientras que aún queda por demostrar si IL-13 es producida por los linfocitos B de las glándulas salivales de los pacientes con SSP, ya que recientemente se ha descrito que tanto las células B normales como las malignas expresan el gen de IL-13^{33,34,36}. Independientemente de su origen T o B en la glándula salival, la IL-13 podría tener un papel en la generación de linfomas de estirpe B, comunes en los pacientes con SSP, actuando de manera ya sea autócrina o parácrina.

En un principio la IL-10 se conoció como una citocina producida por linfocitos T_{H2} , sin embargo, hasta ahora se sabe que las células productoras en el humano son los L- T_{H1} , los L-B y los macrófagos. De manera semejante, la IL-13 también se describió inicialmente como una citocina producida por linfocitos T_{H2} , pero recientemente se conoce su producción por linfocitos B normales de sangre periférica estimulados. La glándula salival es el sitio de latencia de una serie de virus incluyendo los virus de herpes, como el virus de Epstein Barr. Se ha reportado que IL-10 puede promover la proliferación *in vitro* de linfocitos B transformados con el EBV, y que tanto el gen de IL-10 como el de IL-13 pueden expresarse por células B malignas, así como las transformadas con el EBV³⁴. Hay casos de síndrome de Sjögren primario que se desarrollan después de infección de EBV, y otro estudio encontró un incremento de la tendencia de proliferación espontánea de líneas linfoblásticas de células B de CMN de

un aumento en la expresión de ICAM-1 y que participa en la regulación del proceso de migración de linfocitos⁶³. A pesar de que IL-13 participa en diferentes funciones e induce resultados diferentes en el sistema inmune, sus acciones biológicas *in vivo* en la homeostasis del sistema inmune aún no son bien conocidas

Tanto IL-10 como IL-13 son activadores potentes de los linfocitos B; se sabe que IL-10 es una citocina importante en la hiperactividad de los linfocitos B y en el desarrollo de autoinmunidad, mientras que aún queda por demostrar si IL-13 es producida por los linfocitos B de las glándulas salivales de los pacientes con SSP, ya que recientemente se ha descrito que tanto las células B normales como las malignas expresan el gen de IL-13^{33,34,36}. Independientemente de su origen T o B en la glándula salival, la IL-13 podría tener un papel en la generación de linfomas de estirpe B, comunes en los pacientes con SSP, actuando de manera ya sea autócrina o parácrina.

En un principio la IL-10 se conoció como una citocina producida por linfocitos T_{H2} , sin embargo, hasta ahora se sabe que las células productoras en el humano son los L- T_{H1} , los L-B y los macrófagos. De manera semejante, la IL-13 también se describió inicialmente como una citocina producida por linfocitos T_{H2} , pero recientemente se conoce su producción por linfocitos B normales de sangre periférica estimulados. La glándula salival es el sitio de latencia de una serie de virus incluyendo los virus de herpes, como el virus de Epstein Barr. Se ha reportado que IL-10 puede promover la proliferación *in vitro* de linfocitos B transformados con el EBV, y que tanto el gen de IL-10 como el de IL-13 pueden expresarse por células B malignas, así como las transformadas con el EBV³⁴. Hay casos de síndrome de Sjögren primario que se desarrollan después de infección de EBV, y otro estudio encontró un incremento de la tendencia de proliferación espontánea de líneas linfoblásticas de células B de CMN de

sangre periférica de pacientes con síndrome de Sjögren primario, lo cual sugiere un defecto en el control mediado por linfocitos T de células infectadas por el virus de Epstein-Barr. Si asumimos que el EBV se encuentra reactivado en estos pacientes y tiene algún papel patogénico en ellos, la inducción de proliferación de linfocitos B por la IL-10 beneficiaría al virus, ya que el EBV infecta a los L-B y la IL-10/BCRF1 induciría un incremento en el número de células B activadas, que podrían ser blancos de la infección por este virus. El EBV incluso podría sesgar aún más la respuesta inmune local mediante la inducción del gen de IL-10⁷ que podría reducir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias derivadas de macrófagos y de linfocitos T que de otra manera contribuirían en una respuesta inmune antiviral en las zonas cercanas a la célula B infectada, inhibiendo así el ataque inmunológico local.

IL-10 e IL-13 producidas ya sea por linfocitos T y/o B en las glándulas salivales de los pacientes con síndrome de Sjögren primario, podrían actuar sobre células B normales o infectadas de manera autócrina o parácrina induciéndolas a producir inmunoglobulinas, y en particular a tener un incremento en el riesgo de generación de linfomas. Aún queda por determinar de manera más precisa el papel de ambas citocinas en la conducta anormal de los L-B en síndrome de Sjögren primario ya sea hacia hiperactividad o hacia malignidad.

Hasta donde se sabe, este es el primer informe que demuestra la expresión génica *in vivo* de IL-13 en el SSP. La comparación de la producción de IL-10 e IL-13 en células mononucleares de sangre periférica y glándulas salivales de los pacientes, destaca las singularidades de la reacción inmunológica que se desarrolla sistémicamente y la del sitio de lesión. Respecto a ésta última, es evidente que no es

una sola citocina, sino una red de citocinas (producidas tanto por la glándula salival como por el infiltrado linfocitario) la que controla el estado inflamatorio observado en el SSP. Por tanto, se requieren estudios subsecuentes para determinar la fuente y las células blanco, así como la contribución de estas citocinas a la patogénesis del síndrome de Sjögren primario, incluyendo el desarrollo de linfomas no-Hodgkin.

Se necesita también investigar el antagonismo de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias secretadas en la sangre periférica y las glándulas salivales de estos pacientes. Esto dará información relacionada a la patogénesis y/o potencial terapéutico de citocinas específicas inducidas por las células de sangre periférica y de la glándula salival en pacientes con SSP.

CONCLUSIONES.

En los pacientes con síndrome de Sjögren primario encontramos:

- En sangre periférica: un número y proporción menor de linfocitos T-CD4+, y mayor proporción de linfocitos T-CD4 activados y de linfocitos T-CD8+ activados.
- Los linfocitos T expresaron espontáneamente el RNAm de IFN- γ e IL-10.
- Las células mononucleares de sangre periférica secretaron en promedio 50 veces más IL-10 que los controles. Los linfocitos B y macrófagos fueron responsables del 89% de la producción total de IL-10.
- En glándula salival se encontró expresión génica *in vivo* de IL-10 en todos los pacientes estudiados y en la mayoría de ellos, expresión de IL-13.
- Estos hallazgos sugieren que IL-10 e IL-13 podrían contribuir en la patogénesis de este padecimiento, y esto podría explicar las anomalías de los linfocitos B y quizás, el desarrollo de linfomas observados en esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Alarcón-Segovia D. (1984). The pathogenesis of immune dysregulation in systemic lupus erythematosus: a trioka. *J Rheumatol* 11, 5-6.
- 2) Al-Janadi M, Al-Balla S, Al-Dalaan A, Raziuddin S. (1993). Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *J Clin Immunol* 13, 58-67.
- 3) Alspaugh MA, Tan EM. (1975). Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 55, 1067-1073.
- 4) Arnett FC, Hamilton RG, Reveille JD, Bias WB, Harley JB, Reichlin M. (1989). Genetic studies of Ro (SS-A) and La (SS-B) autoantibodies in families with systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 32, 413-419.
- 5) Aziz KE, McCluskey PJ, Wakefield D. (1994). Phenotypic and functional abnormalities in the peripheral blood T-cells of patients with Primary Sjögren's syndrome. *Cytometry* 18, 35-41.
- 6) Baboonian C, Venables PJW, Booth J, Williams DG, Roffe LM, Maini RN. (1989). Virus infection induces redistribution and membrane localization of the nuclear antigen La (SS-B): a possible mechanism for autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 78, 454-459.
- 7) Benjamin D, Knobloch TJ, Dayton MA. (1992). Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of IL-10. *Blood* 80, 1289-1298.
- 8) Bloch KJ, Buchanan W, Wohl MJ, Bunim JJ. (1992). Sjögren's syndrome. A clinical, pathological, and serological study of sixty-two cases. *Medicine* 71, 386-401.
- 9) Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL, Schleimer RP. (1995) IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J. Immunol.* 154, 799-806.
- 10) Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. *J Biol Chem* 267, 23301-23308.

- 11) Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. (1995). Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 34, 326-333.
- 12) Brain P, Gordon J, Willets W. (1970). Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 6, 681-688.
- 13) Brown KD, Zurawski SM, Mosman T, Zurawski G. (1989). A family of small inducible proteins secreted by lymphocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors and indicators of various activation processes. *J Immunol* 142, 679-687.
- 14) Burdin N, Pérone C, Banchereau J, Roussett F. (1993). Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin-10. *J Exp Med* 177, 295-304.
- 15) Caretto A, Ostuni PA, Chieco-Bianchi F, Pedini B, Spadaccino AC, Bagnasco M, Todesco S, Betterle C. (1995). An immunohistochemical study of immunological phenomena in minor salivary glands in patients with Sjögren's syndrome. (1995). *Rheumatol Int* 15, 51-55.
- 16) Cattaneo R, Tosoni C, Franzini MT. Antibodies to retroviral proteins in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Diseases* 52, 8.
- 17) Centers for Disease Control: Guidelines for the Performance of CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus infection. *MMWR RR-8*, Vol. 42: 1992.
- 18) Coll J, Tomás S, Vilella R, Corominas J. (1995). Interleukin-2 receptor expression in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 22, 1488-1491.
- 19) Constantopoulos, S.H. and Moutsopoulos, H.M. (1987) en: Sjögren's syndrome. Clinical and immunological aspects. N. Talal, H.M. Moutsopoulos, S.S. Kassan, Ed. Springer/Verlag, London, pp 83-87.
- 20) Cooke A. (1991). Is there restricted T cell receptor usage in autoimmune disease? *Clin Exp Immunol* 83, 345-346.
- 21) Chan EKL, Andrade LEC. (1992). Antinuclear antibodies in Sjögren's syndrome. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18, 551-570.
- 22) Chen WF, Zlotnik A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 147, 528-534.
- 23) Chernoff A, Granowitz E, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel J, Kennedy J, Rabson A, Wolff S, Dinarello C. (1995). A randomized, controlled trial

- 11) Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. (1995). Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 34, 326-333.
- 12) Brain P, Gordon J, Willels W. (1970). Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 6, 681-688.
- 13) Brown KD, Zurawski SM, Mosman T, Zurawski G. (1989). A family of small inducible proteins secreted by lymphocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors and indicators of various activation processes. *J Immunol* 142, 679-687.
- 14) Burdin N, Pérone C, Banchereau J, Roussett F. (1993). Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin-10. *J Exp Med* 177, 295-304.
- 15) Caretto A, Ostuni PA, Chieco-Bianchi F, Pedini B, Spadaccino AC, Bagnasco M, Todesco S, Betterle C. (1995). An immunohistochemical study of immunological phenomena in minor salivary glands in patients with Sjögren's syndrome. (1995). *Rheumatol Int* 15, 51-55.
- 16) Cattaneo R, Tosoni C, Franzini MT. Antibodies to retroviral proteins in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Diseases* 52, 8.
- 17) Centers for Disease Control: Guidelines for the Performance of CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus infection. *MMWR RR-8*, Vol. 42: 1992.
- 18) Coll J, Tomás S, Villela R, Corominas J. (1995). Interleukin-2 receptor expression in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 22, 1488-1491.
- 19) Constantopoulos, S.H. and Moutsopoulos, H.M. (1987) en: Sjögren's syndrome. Clinical and immunological aspects. N. Talal, H.M. Moutsopoulos, S.S. Kassan, Ed. Springer/Verlag, London, pp 83-87.
- 20) Cooke A. (1991). Is there restricted T cell receptor usage in autoimmune disease? *Clin Exp Immunol* 83, 345-346.
- 21) Chan EKL, Andrade LEC. (1992). Antinuclear antibodies in Sjögren's syndrome. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18, 551-570.
- 22) Chen WF, Zlotnik A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 147, 528-534.
- 23) Chernoff A, Granowitz E, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel J, Kennedy J, Rabson A, Wolff S, Dinarello C. (1995). A randomized, controlled trial

of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 154, 5492-5499

24) Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosman T. (1987) Two types of mouse helper T cell clone. III Further differences in lymphokines synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 166, 1221-1244.

25) Dang H, Lazaridis K, Aufdemorte T. (1993). PCR analysis of cytokines in salivary glands of Sjögren's syndrome patients. *Clin Rheum* 12,18-22.

26) Daniels TE. (1984). Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome assesment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 27,147-156.

27) De Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries JE. (1993). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN- γ or IL-10. *J Immunol* 151, 6370-6381.

28) de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, de Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T-cell proliferation by diminishing the antigen-specific capacity of monocytes via downregulation of class II MHC expression. *J Exp Med* (1991) 174, 915-924.

29) De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autorregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174,1209-1217.

30) Defrance T, Carayon P, Bilhain G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, Ferrara P.(1994). Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 179, 135-143.

31) Del Prete, GF, De Carli M, Almerigogna F, Giudddizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150, 3353-360.

32) Dighiero G, Lymberi P, Guilbert B, Temynck T, Avrameas S. (1986). Natural autoantibodies constitute a substantial part of normal circulating immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci* 475, 135-145.

33) Emilie D, Toutilou R, Raphael M, Peuchmaur M, Deverqne O, Rea D, Coumbraras J, Crevon MC, Edelman L, Joab I, Galanaud P. (1992). In vivo production of interleukin-10 by malignant cells in AIDS lymphomas. *Eur J Immunol* 22, 2937-2942.

34) Emilie D, Zou W, Fior R, Llorente L, Durandy A, Crevon MC, Maillot MC, Durand-Gasselini I, Raphael M, Peuchmaur M, Galanaud P. (1996). Production and role of IL-6, IL-10 and IL-13 in B lymphocytes malignancies, and in B lymphocyte hyperactivity of HIV infection and autoimmunity. *J Immunol Methods* (en prensa)

35) Ferrarini M, Steen V, Mesdger TA, Whiteside TL (1990). Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 79, 346-352.

36) Fior R, Vita N, Raphael M, Minty A, Maillot MC, Crevon MC, Caput D, Biberfeld P, Ferrara P, Galanaud P, Emilie D. (1994). Interleukin-13 gene expression by malignant and EBV-transformed human B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 5, 593-600.

37) Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosman T, Howard M, Moore K, Garra A. (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 147; 3444-3451.

38) Fiorentino DF, Bond MW, Mosman T. (1989). Two types of mouse T helper cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081-2090.

39) Flescher E, Talal N. (1991). Do virus contribute to the development of Sjögren's syndrome? *Am J Med* 90, 283-285.

40) Fox R, Bumbol T, Fantozzi R, Bone R, Schreiber R. (1986). Expression of histocompatibility antigen HLA-DR by salivary gland epithelial cells in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 29, 1105-1111.

41) Fox R, Luppi M, Pisa P, Kang HI. (1992). Potential role of Epstein-Barr virus in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* (suppl. 32) 19, 18-24.

42) Fox RI, Kang H-I, Ando D, Abrams J, Pisa E. (1994). Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 152, 5532-5539.

43) Fox RI, Kang HI. (1992) Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 18, 517-538.

44) Fox RI, Theofilopoulos AN, Altman A. (1985). Production of interleukin-2 (IL-2) by salivary gland lymphocytes in Sjögren's syndrome: detection of reactive cells by using antibody directed to synthetic peptides of IL-2. *J Immunol* 135, 3109-3116.

45) Fox RI, Pearson G, Vaughan JH. (1986). Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* 137,3162-3170.

46) Freimark B, Fantozzi R, Bone R, Bordin G, Fox R. (1989). Detection of clonally expanded salivary gland lymphocytes in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 32, 859-869.

47) Fujisaku A, Barton Frank M, Neas B, Reichlin M, Harley J. (1990). HLA-DQ gene complementation and other histocompatibility relationships in man with the anti-Ro/SSA autoantibody response of systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 86, 606-611.

48) Gaston JSH, Rowe M, Bacon. (1990). Sjögren's syndrome after infection by Epstein barr virus. *J Rheumatol* 17, 558-561.

49) Gauchat JF, Gauchat D, De Weck AL, Stadler BM. (1989). Cytokine mRNA levels in antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 19, 1079-1085.

50) Gerli R, Berotto A, Agea E, Lanfrancone L, Cernetti C, Spinozzi F, Rambotti P. (1990). Basis for a defective proliferation of peripheral blood T cells to anti-CD2 antibodies in primary Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 86, 1870-1877.

51) Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosman T, Moore KW, Howard M. (1990). Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X-chromosome-linked immunodeficiency cells. *J Exp Med* 172, 1625-1631.

52) Green JE, Hinrichs SH, Vogel J, Jay G. (1989). Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* 341, 72-74.

53) Haddad J, Deny P, Munz-Goetheil C, Ambrosini JC, Trinchet JC, Pateron D, Mal F, Callard P, Beaugrand M. (1992). Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 339, 321-324.

54) Hamilton RG, Harley JB, Bias WB, Roebber M, Reichlin M, Hochberg MC, Arnett FC. (1988). Two Ro (SS-A) autoantibody responses in systemic lupus erythematosus. Correlation of HLA-DR/DQ specificities with quantitative expression of Ro (SS-A) autoantibody. *Arthritis Rheum* 31, 496-505.

55) Harley JB, Reichlin M, Arnett F, Alexander EL, Bias W B, Provost TT. (1986). Gene interaction at HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjögren's syndrome. *Science* 232, 1145-1147.

56) Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosman T, Moore KW. (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 250, 830-832.

57) Ichikawa Y, Shimizu H, Yoshida M and Armori S. (1992). Accessory molecules expressed on the peripheral blood or synovial fluid T lymphocytes from

patients with Sjögren's syndrome or rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 10, 447-454.

58) Ichikawa Y, Shimizu M, Arimori S. (1990). Activation antigens expressed on T cells of the peripheral blood in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 8, 243-249.

59) Ichikawa Y, Shimizu H, Yoshida M, Arimori S. (1990). Activation of T cell subsets in the peripheral blood of patients with Sjögren's syndrome. Multicolor flow cytometric analysis. *Arthritis Rheum* 33, 1674-1681.

60) Inoue N, Harada S, Miyasaka N, Oya A, Yanagi K. (1991). Analysis of antibody titers to Epstein-Barr virus nuclear antigens in sera of patients with Sjögren's syndrome and with rheumatoid arthritis. *J Infectious Diseases* 164, 22-28.

61) Jamin C, Lamour A, Pennec L, Hirn M, Le Goff P, Youinou P. (1993). Expression of CD5 and CD72 on T and B cells subsets in rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 92, 245-250.

62) Janin A, Morel P, Quiquandon I, Farre I, Hatron PY, Baulers F, Gosselin B. (1992). Non-Hodgkin's lymphoma and Sjögren's syndrome. An immunopathological study of 113 patients. *Clin Exp Rheumatol* 10, 565-570.

63) Jinquan T, Deleuran B, Gesser B, Maare H, Deleuran M, Larsen CG, Thestrup-Pedersen T. (1995). Regulation of human T lymphocyte chemotaxis in vitro by T cell-derived cytokines IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, and IL-13. *J Immunol* 154, 3742-3752.

64) Jondal M, Holm G, Wigzell H. (1972). Surface markers on human T and B lymphocytes I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med* 136, 207-215.

65) Jonsson R, Klareskog L, Backman K, Tarkowski A. (1987). Expression of HLA-D-locus (DP, DQ, DR)-coded antigens, β_2 -microglobulin, and the interleukin 2 receptor in Sjögren's syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 45, 235-243.

66) Kreig AM, Steinbrg AD. (1990). Review. Retroviruses and autoimmunity. *J Autoimmunity* 3, 137-166.

67) Laffón A, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. (1983). Respuesta a la mezcla autóloga de linfocitos. Características, elementos celulares y su cinética en enfermedades autoinmunes. *Inmunología* 2: 97-107.

68) Lagoo-Deenadayalan S, Lagoo AS, Barber WH, Hardy KJ. (1993). A standardized approach to PCR-based semiquantitation of multiple cytokine gene transcripts from small cell samples. *Lymphokine and Cytokine Research* 12, 59-67.

- 69) Legoux P, Minty C, Delpech B, Minty A, Shire D. (1993). Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin-1 β stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerization chain reaction method involving co-amplification with an internal multi-specific control. *Eur Cytokine Res* 4, 553-562.
- 70) Lindahl G, Hedfors E, Kloreskog L, Forsum U. (1985). Epithelial HLA-DR expression and T-cell subsets in salivary glands in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 61, 475-479.
- 71) Loken M, Brosnan J, Bach B, Ault K. (1990). Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry* 11, 453-458.
- 72) Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela, J, Morel B, Brouet J, Alarcón-Segovia D, Galanaud, P, Emilie, D. (1995). Role of interleukin-10 in the B lymphocyte hiperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 181: 839-844.
- 73) Mac Neil IA, Suda T, Moore KW, Mosman T, Zlotnik A. (1990). IL-10, a novel growth co-factor for mature and immature T cells. *J Immunol* 145, 4167-4173.
- 74) Mackenzie ANJ, Li X, Largaespada DA, Sato A, Kaneda A, Zurawski SM, Doyle EL, Milatovich A, Francke U, Copeland NG, Jenkins NA, Zurawski G. (1993). Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J Immunol* 150, 5436-5444.
- 75) Mariette X, Zerbib M, Jaccard A, Schenmetzler C, Danon F, Clauvel JP. (1993). Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 36, 280-281.
- 76) Maurer D, Feltzman T, Holter W, Petera P, Smolen J, Knapp W. (1992) Evidence for the presence of activated CD4 T cells with naive phenotype in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 87, 429-434.
- 77) McKenzie, A.N.J., Culpeper, J.A., de Waal Malefyt, R., Briere, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G., Menon, S., De Vries, J.E., Banchereau J, Zurawski G. (1993). Interleukin-13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3735-3739.
- 78) Melendro EL, Saldate C, Rivero S, Alarcón-Segovia D. (1983). T cell subpopulations in the peripheral blood of patients with connective tissue diseases as determined by flow cytometry using monoclonal antibodies. *Clin Immunol Immunopathol* 27, 340-347.
- 79) Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X., Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, Minty C, Casellas P, Loison G, Lupker J,

Shire D, Ferrara P, Caput D. (1993). IL 13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 362,248-250

80) Moore KW, Vieira P, Florentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosman T (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248, 1230-1234.

81) Mosman T. (1994). Properties and functions of IL-10. *Adv Immunol* 56, 1-28.

82) Mosman T. (1994). *The Cytokine Handbook*. Interleukin 10. Academic Press, A Thompson Ed, 2nd edition, Cap 12, pp 223-237.

83) Moutsopoulos HM. (1993). Immunopathology of Sjögren's syndrome: more questions than answers. *Lupus* 2, 209-211.

84) Moutsopoulos HM, Hooks JJ, Chan CC, Dalavanga YA, Skopouli FN, Detrick B. (1986). HLA-DR expression by labial minor salivary gland tissues in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 45, 677-683.

85) Moutsopoulos HM (1988). Immunopathogenesis of Sjögren's syndrome. *Isr J Med Sci* 24, 737-739.

86) Ngou J, Graafland H, Segondy M. (1992). Antibodies against polypeptides of purified Epstein-Barr virus in sera of patients with connective tissue diseases. *J Autoimmunity* 5, 243-249.

87) Pablos JL, Carreira PE, Morillas L, Montalvo G, Ballestin C, Gómez-Reino JJ (1994). Clonally expanded lymphocytes in the minor salivary glands of Sjögren's syndrome patients without lymphoproliferative disease. *Arthritis Rheum.* 37,1441-1450.

88) Papasterides CA, Skoupoli FN, Drosos AA, Andronopoulos AP, Moutsopoulos HM. (1988). HLA-antigen associations in Greek patients with Sjögren's syndrome. *J Autoimmunity* 1, 85-90.

89) Pease CT, Charles PJ, Shattles W, Markwick J, Maini RN. (1993). Serological and immunogenetic markers of extraglandular primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 32, 574-577.

90) Pérez L., Orte J., Brieva J.A. (1995). Terminal differentiation of spontaneous rheumatoid factor-secreting B cells from rheumatoid arthritis patients depends on endogenous interleukin-10. *Arthritis Rheum* 38, 1771-1776.

91) Pisa E, Pisa P, Kang HI, Fox R. (1991). High frequency of t(14;18) translocation in salivary gland lymphomas from Sjögren's syndrome patients. *J Exp Med* 174, 1245-1250.

92) Price, E.J. and Venables, P.J.W. (1995). The etiopathogenesis of Sjögren's syndrome. *Semin. Arthritis Rheum.* 25,117-133.

93) Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie ANJ, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. (1993). Interleukin-13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3730-3734.

94) Punnonen J, de Vries JE. (1994) IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J Immunol* 152, 1094-1102.

95) Renard N, Duvert V, Banchereau J, Saeland S. (1994). Interleukin-13 inhibits the proliferation of normal and leukemic human B-cell precursors. *Blood* 84, 2253-2260.

96) Reveille JD, Arnett F. (1992). The immunogenetics of Sjögren's syndrome. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18, 539-550.

97) Reveille JD, Macleod MJ, Whittington K, Arnett FC. (1991). Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 chain genes promote the Ro (SS-A)/La (SSB) autoantibody responses. *J Immunol* 146, 3871-3876.

98) Romagnani S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Ann Rev Immunol* 12, 227-257.

99) Roumm AD, Whiteside TL, Mesdger TA, Rodman AP. (1984). Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 27, 645-653.

100) Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. (1992). IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1890-1893.

101) Rowe D, Griffiths M, Stewart J, Novick D, Beverly PCL, Isenberg DA. (1987). HLA class I and II, interferon, interleukin 2, and the interleukin 2 receptor expression on labial biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 46, 580-586.

102) Rutenfranz I, Kruse A, Kirchner H. (1991) *In situ* hybridization of interferon-gamma producing peripheral blood mononuclear cells. *Scan J Immunol* 34, 169-178.

103) Saito I, Serenius B, Compton T, Fox R. (1989). Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *J Exp Med* 169, 2191-2198.

- 104) Sato K, Miyasaka N, Yamaoka K, Okuda M, Yata J, Nishioka K. (1987) Quantitative defect of CD4+2H4+ cells in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 30, 1407-1411.
- 105) Savino W, Dardenne M. (1995). Immune-neuroendocrine interactions. *Immunol Today* 16, 318-322.
- 106) Scofield RH, Harley J. (1991). Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci* 88, 3343-3347.
- 107) Scofield RH, Harley J. (1994). Association of anti-Ro/SSA autoantibodies with glutamine in position 34 of DQA1 and leucine in position 26 of DQB1. *Arthritis Rheum* 37, 961-962.
- 108) Schattner A. Review: interferons and autoimmunity. (1988). *Am J Med Sci* 31, 532-544.
- 109) Sela O, Shoenfeld Y. (1988). Cancer in autoimmune diseases. *Sem Arthr Rheumatism* 18, 77-87.
- 110) Shull M, Ormsby I, Kier AB. Targeted disruption of the mouse TGF- β gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1993; 359: 693-699.
- 111) Skopouli FN, Fox P, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffe ES, Moutsopoulos HM. (1991). T cell subpopulations in the labial salivary gland histopathologic lesion of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 18, 210-214.
- 112) Skopouli FN, Kousvelari EE, Mertz P, Jaffe ES, Fox PC, Moutsopoulos HM. (1992). c-myc mRNA expression in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 19, 693-699.
- 113) Skopouli FN, Dorsos AA, Papaioannu T, Moutsopoulos HM. (1986). Preliminary diagnostic criteria for Sjögren's syndrome. *Scan J Rheumatol Suppl.* 61, 22-25.
- 114) Smith KA, Cantrell DA. (1985). Interleukin-2 regulates its own receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 864-868.
- 115) Struyf NJ, Snoeck HW, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. (1990). Natural cell activity in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: stimulation with interferons and interleukin-2 and correlation with immune complexes. *Ann Rheum Dis* 49, 690-693.
- 116) Sumida T, Yonaha F, Maeda T, Tanabe E, Koike T, Tomioka H, Yoshida S. (1992). T cell receptor repertoire of infiltrating T cells in lips of Sjögren's syndrome patients. *J Clin Invest* 89, 681-685.

- 117) Taga K, Tosato G. (1992). IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148, 1143-1148
- 118) Talal N, Asofsky R, Lightbody P. (1970). Immunoglobulin synthesis by salivary gland lymphoid cells in Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 49, 2868-2880
- 119) Talal N, Bunim J. (1964). The development of malignant lymphoma in the course of Sjögren's syndrome. *Am J Med* 36, 529-540.
- 120) Talal N, Dauphinée MJ, Dang H, Alexander SS, Hart DJ, Garry RF. (1990). Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Arthritis Rheum* 33, 774-781.
- 121) Talal N. (1992). Sjögren's syndrome: historical overview and clinical spectrum of disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18, 507-515.
- 122) Tateishi M, Saito I, Yamamoto K, Miyasaka N. (1993). Spontaneous production of Epstein Barr virus by B lymphoblastoid cell lines obtained from patients with Sjögren's syndrome. Possible involvement of a novel strain of Epstein-Barr virus in disease pathogenesis. *Arthritis Rheum* 36, 827-835.
- 123) Te Velde AA, de Waal Malefyt R, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG. (1992). IL-10 stimulates monocyte FcγR surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-γ, IL-4 and IL-10. *J Immunol* 149, 4048-4052.
- 124) Thomson AW, Lotze MT. (1994). Interleukin 13, 14 and 15. The cytokine handbook. Angus Thomson Academic Press. pp 257-263.
- 125) Tzioufas AG, Katsikis PD, Youinou PY, Moutsopoulos HM. (1990). Sjögren's syndrome: an oligo-monoclonal B cell process. *Clin Exp Rheumatology* 8 (suplemento), 17-21.
- 126) Venables P, Brooks S. (1992). Retroviruses: potential aetiological agents in autoimmune rheumatic disease. *Br J Rheumatol* 31, 841-846.
- 127) Vieira P, de Waal Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, DeVries JE, Roncarolo MG, Mosman T, Moore KW. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibition factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1172-1176.
- 128) Vitali C, Moutsopoulos H, Bombardieri S and the European Community study group on diagnostic criteria for Sjögren's syndrome. (1994). *Ann Rheum Dis* 53, 637-647.

129) Vitali C, Tavoni A, Rizzo G, Neri R, D'Ascanio AD, Cristofani R, Bombardieri S. (1986). HLA antigens in Italian patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 45, 412-416.

130) Waalen K, Sioud M, Natvig JB, Forre O. (1992). Spontaneous *in vivo* gene transcription of interleukin-2, interleukin-3, interleukin-4, interleukin-6, interferon gamma, interleukin-2 receptor (CD25) and proto-oncogene c-myc by rheumatoid synovial T lymphocytes. *Scan J Immunol* 36, 865-873.

131) Whittingham S, Mc Neilage J, Mackay, I R (1985). Primary Sjögren's syndrome after infectious mononucleosis. *Ann. Int. Med.* 102,490-495.

132) Youinou P, Mackenzie L, le Masson G, Papadopoulos NM, Jouquan J, Pennec YL, Angelidis P, Katsikis P, Moutsopoulos HM, Lydyard PM. (1985) CD5-expressing B lymphocytes in the blood and salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 1, 185-194.

133) Yssel H, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa, R, Spits H. and de Vries, J.E. (1992). IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 149, 2378-23.

134) Zumla A, Mathur M, Stewart J, Wilkinson L, Isenberg D. (1991). T cell receptor expression in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 50, 691-693.

135) Zurawski G, de Vries JE. (1994). Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 15, 19-26.

ANEXO

Características clínicas de los pacientes con diagnóstico de síndrome de Sjögren primario incluidos en el presente trabajo.

Paciente	sexo	edad (años)	evolución (años)	tratamiento	manifestaciones extraglandulares
ACA	F	37	13	2.5 mg PDN	no
ACO	F	58	4	-	calcificaciones idiopáticas
AMF	F	60	28	no esteroideo	no
ARV	F	65	21	-	no
AYI	F	36	2	-	no
BSG	F	82	5	-	no
CFG	F	62	10	-	no
FRA	F	42	6	-	no
GAM	F	36	3	-	no
IPV	F	45	4	no esteroideo	hipotiroidismo ¹
IS	F	33	5	-	no
JAS	F	42	6	no esteroideo	no
JQF	M	48	3	3.75 mg PDN	no
MGE	F	36	4	-	no
MMM	F	49	2	-	Raynaud, hipertensión ²
NEB	F	59	9	no esteroideo	púrpura ²
PGL	F	33	18	-	no
SGH	F	29	16	-	no
SRG	F	42	8	30 mg PDN	glomerulonefritis ³
YMP	F	44	33	no esteroideo	Raynaud ¹ , cirrosis biliar ⁴

F, paciente femenino; M, paciente masculino. PDN, prednisona. ¹Como antecedente. ²Manifestaciones en el momento del estudio. ³La glomerulonefritis ocurrió 8 meses antes del estudio. ⁴Virus A y B de hepatitis negativo, "probable hepatitis C".

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CYTOKINE GENE AND CD25 ANTIGEN EXPRESSION BY PERIPHERAL BLOOD T CELLS FROM PATIENTS WITH PRIMARY SJÖGREN'S SYNDROME

GILDA M. VILLARREAL, JORGE ALCOGER-VARELA AND LUIS LLORENTE*

Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México, D.F. 14000

(Received 19 December 1994; in final form 19 April 1995)

We studied mononuclear cell subsets in 17 patients with primary Sjögren's syndrome (PSS) and in 11 normal controls by flow cytometry. We found a decreased percentage of CD4+ cells ($p = 0.027$) and a higher percentage of CD8+ cells in patients as compared to controls. In both, CD4+ cells and CD8+ cells, CD25 antigen was overexpressed ($p = 0.005$ and $p = 0.025$, respectively as compared to controls). We then measured spontaneous mRNA cytokine expression by T cells from 7 PSS patients and 5 normal controls by coupled reverse transcription-polymerase chain reaction. We found spontaneous mRNA expression for IFN- γ , IL-10, IL-13 as well as for CD25. Our results suggest an overall T cell activation in PSS patients and provides evidence of a T cell cytokine regulatory imbalance which may play a role in the pathogenesis of this disease.

KEY WORDS: Primary Sjögren's syndrome, interleukin 2 receptor, T cell activation, interferon- γ , interleukin-10, interleukin-13.

INTRODUCTION

Primary Sjögren's syndrome (PSS) is a chronic autoimmune disease with a wide clinical spectrum. It is defined by the simultaneous presence of keratoconjunctivitis sicca and xerostomia in patients not fulfilling criteria for any other chronic inflammatory connective tissue disease¹. This disorder is characterized by an immune system hyperreactivity expressed by hypergammaglobulinaemia, multiple organ and non-organ specific autoantibodies and focal lymphocytic infiltration of the exocrine glands².

Lymphocyte subpopulations and their subsets in the peripheral blood of PSS patients have been studied to determine their immunoregulatory status, and several alterations that can explain some of the immunologic abnormalities in PSS have been recognized³⁻¹⁰. These studies, however, have revealed inconclusive results. Although decreased numbers of T-helper cells (CD4+), T suppressors cells (CD8+), a quantitative defect of T cell suppressor/inducer subpopulations (CD4 2H4+), and increased levels of CD5+ B cells have been observed. A diminished function in natural killer cells has also been reported¹¹.

With respect to cytokines in PSS, some studies have revealed a diminished production of IL-2 by peripheral blood lymphocytes¹², an increased production of IL-10¹³, as well as increased serum levels of IL-6, and IFN- γ ¹⁴.

In the present study we reevaluated mononuclear cell subsets in patients with PSS by flow cytometry, and identified the CD25 antigen (low affinity IL-2 receptor) overexpressed on T cells, including CD4+ cells and CD8+ cells. Moreover, we report the use of a semi-quantitative PCR method to analyze spontaneous cytokine mRNA expression in peripheral blood T cells from patients with PSS and controls.

PATIENTS AND METHODS

Seventeen patients (16 females and 1 male) with PSS and with no evidence of infection were studied. All patients fulfilled the criteria for the diagnosis of PSS¹. Their age ranged from 29 to 82 years (mean 47.4 years). Eleven patients were not receiving any systemic treatment at the time of the study. Four were receiving non-steroidal antiinflammatory drugs, and two were receiving prednisone (5 mg and 30 mg/day respectively). Eleven healthy volunteers (aged from 29 to 87 years) were studied as controls. All patients and controls were informed about the objectives and methods of the study and gave their consent.

*To whom correspondence should be addressed at Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Department of Immunology and Rheumatology, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México D.F. 14000 México, Fax: (525) 573-20-96.

Immunofluorescence Staining

Peripheral blood was collected in EDTA by venipuncture. Fifteen microliters of each mouse monoclonal antibodies directly conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) were placed in separate 5 ml Falcon test tubes (Becton Dickinson, San Jose, CA) and 150 μ l of whole blood were added to each tube, mixed and incubated for 20 min at room temperature with intermittent gentle agitation; 2 ml of FACS Lysing solution (Becton Dickinson) was added for 10 min after which cells were pelleted by centrifugation. Cells were washed with PBS and resuspended in 3% formaldehyde (in PBS, pH 7.2). Samples were kept at 4°C in the dark and analyzed within 24 hours of preparation. One or two color antibodies were used for cell surface staining. Mouse isotypic controls were included to assess non-specific interactions. All monoclonals were obtained from Becton Dickinson and included antibodies to surface antigens CD45, CD14, CD3, CD4 CD5, CD8, CD19, CD25 and CD56.

Sample Analysis

Lymphocyte subsets were enumerated in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) by standard methods¹⁵. An analysis gate was defined by both, immunofluorescence (CD45/CD14) and forward (FSC) and right angle light scattering (SSC)¹⁶. The proportion of lymphocytes within the preparation was determined and > 98% were included in the analysis gate. Absolute numbers were determined after correction for non-lymphocytes within the analysis gate and were calculated by multiplying the total leukocyte count in the peripheral blood by the percentage of lymphocytes and by the corrected percentage of positive cells for each surface marker. A total of 10,000 events were collected for each determination.

Purification of T Cells

Peripheral blood mononuclear cells were isolated on Histopaque (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) by

gradient centrifugation. Cells were cultured for 2 hours on plastic petri dishes. Non-adherent cells were rosetted for one hour with 2-aminoethylisothiuronium bromide (AET) (Sigma)-treated sheep red blood cells (SRBC)^{17,18}. AET-SRBC rosetting cells (T cells) were enumerated and pellets of 5 million cells were frozen at -70°C. T cells were on average more than > 95% CD3+ cells.

Detection of Cytokine mRNA by Coupled Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA was isolated from 5 million frozen T cells using the Trizol technique according to the manufacturer's recommendations (Gibco-BRL, Gaithersburg, MI). Purified RNA was treated with 10 units of RNase-free DNase I (Gibco-BRL) at 37°C for 30 min, then with phenol, chloroform/isoamyl alcohol and finally precipitated with ethanol. cDNA synthesis was performed using 1 μ g of RNA that was incubated with 50 U of Moloney Leukemia Virus RT (Gibco-BRL) in the presence of 2.5 μ M oligo [d(T)₁₂₋₁₈] (Gibco-BRL), and 0.5 mM of each of the four deoxynucleotide triphosphates. Resulting cDNA was divided in 8 aliquots. For PCR amplification of the cDNA products, 3 μ M of the different sets of oligonucleotides of each antisense and sense primers (Table 1), and 2 units of Taq polymerase (Perkin-Elmer Corporation, Branchburg, NJ) were added to the reaction mixture to each of the 8 cDNA aliquots. Amplification was at 94°C for 1 min; 55°C for 1 min; and 72°C for 1 min for 28 cycles. The PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels containing 0.05 μ g/ml ethidium bromide. All samples were screened in parallel for β 2- μ globulin. Negative controls included samples in which the addition of RT was omitted during the processing, and samples without cDNA during the PCR reaction. Gels were photographed using a Polaroid land film (Type 665). Polaroid negatives were used for densitometric analysis. The intensity of the bands was estimated and all values were normalized to the β 2- μ globulin positive control included in each PCR determination, to a value of 1.

Table 1 Primer sequences for PCR amplification

mRNA	Sense primer	Antisense primer	(bp)*
β 2- μ glob	5'CCAGCAGAGAATGGAAAGTC 3'	5'GATGCTGCTTACATGTCTCG 3'	268
IL-2	5'GTCACAAACAGTGACACCTAC 3'	5'ATGGTTGCTGTCTCATCAGC 3'	352
IL-2r	5'GTGAAATGGAGACCAGTCAG 3'	5'TCTACTCTTCCCTCTGTCTCC 3'	250
IL-4	5'TGCCTCCAAGAACAACACTG 3'	5'AACGTACTCTGGTTGGCTTC 3'	224
IL-10	5'AAATTTGGTTCTAGGCCGGG 3'	5'GAGTACAGGGGCATGATATC 3'	264
IL-13	5'GAGTGTGTTTGTACCCGTTG 3'	5'TACTCGTTGGCTGAGAGCTG 3'	253
IFN- γ	5'GCAGAGCCAAATTGTCTCCT 3'	5'ATGCTCTTCGACCTCGAAAC 3'	290

*Size in base pairs of amplified cytokine product.

Statistical Analysis

Mann-Whitney's *U*-test was used to compare results from normal controls versus PSS patients.

RESULTS

Data on lymphocyte subsets stained by monoclonal antibodies are presented in Table 2. We found a decrease of the percentage of CD4+ cells in patients with PSS as compared to that obtained in healthy controls ($p = 0.027$), this difference remained significant when absolute counts were considered (data not shown), although the percentage of CD4+ cells expressing the CD25 antigen was significantly higher in patients than in controls ($p = 0.005$). A representative experiment is shown in Figure 1. The percentage of peripheral blood lymphocytes expressing both CD3 and CD8 antigens was increased in patients compared to that of the controls ($p = 0.068$). CD8+CD25+ cells were also significantly higher in PSS patients than in normal subjects ($p = 0.025$), this difference remained significant when absolute counts were considered (data not shown). No significant differences were observed as far as other surface markers were concerned.

Expression of Cytokine Genes by T Cells from PSS Patients

These data suggested that both, CD4+ and CD8+ T cells may have been previously activated *in vivo*. This led us to analyze the cytokine gene expression profile of T cells. We measured spontaneous mRNA

Table 2 Mononuclear cell subpopulations among patients with PSS and normal controls

Surface marker	Patients (n = 17)	Controls (n = 11)	P
CD3	64.3 ± 10.6*	65.1 ± 11.5	N.S.**
CD4	36.8 ± 5.1	44.3 ± 10.2	0.027
CD19	14.7 ± 6.5	11.6 ± 3.4	N.S.
CD56	14.7 ± 7.2	12.4 ± 6.7	N.S.
CD3/CD8	26.1 ± 6.5	20.4 ± 6.5	0.068
CD19/CD5	5.5 ± 4.0	3.4 ± 2.2	N.S.
CD4/CD25	10.5 ± 7.9	4.5 ± 2.2	0.005
CD8/CD25	1.7 ± 4.6	0.2 ± 0.18	0.025

*Percentage ± standard deviation from gated lymphocytes

**N.S., non significant

cytokine expression by T cells from 7 randomly selected untreated PSS patients and from five normal subjects by RT-PCR. We determined for each sample the ratio of the band intensity between cytokines and $\beta 2$ - μ globulin RT-PCR products. The results are shown in Table 3. Of the 7 PSS T cell samples analyzed, 5 samples exhibited mRNA expression for IFN- γ . Five exhibited mRNA expression for IL-10 and 4 of these that for IL-13. Two T cell samples exhibited simultaneously mRNA expression for IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 and IFN- γ . Finally, five T cell samples scored positive for the α chain of IL-2 receptor (IL-2r) mRNA expression. A representative cytokine profile in T cell samples from PSS and from a normal subject is shown in Figure 2. We were unable to detect any cytokine mRNA in two T cell samples from PSS patients. In four of the five normal T cells preparations we were able to detect any mRNA tested. One control scored

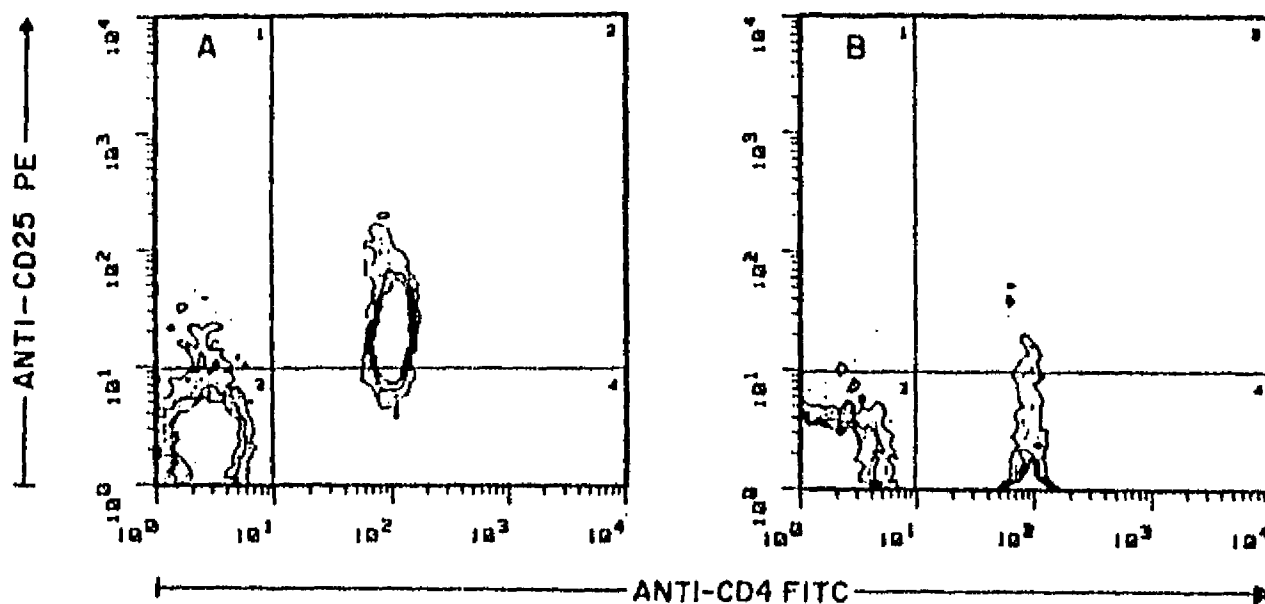


Figure 1 CD4-FITC and CD25-PE binding to T cells from PSS patients and control subjects. Representative cytofluorometric pattern from one PSS patient (A) and one control (B).

Table 3 Semi-quantitation of cytokine gene expression in T cell samples from patients with PSS

	IL-2	IL-2r	IL-4	IL-10	IL-13	IFN- γ
Patient 1	0.000*	0.312	0.000	0.410	0.000	0.525
Patient 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Patient 3	0.172	0.264	0.184	0.267	0.196	0.637
Patient 4	0.087	0.531	0.213	0.520	0.354	0.527
Patient 5	0.056	0.376	0.000	0.093	0.234	0.288
Patient 6	0.000	0.166	0.000	0.290	0.157	0.200
Patient 7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

*For each sample the ratio of the band intensity between β 2-globulin and cytokines was calculated as described in methods.



Figure 2 Cytokine mRNA amplification in T cells from PSS. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to amplify mRNA coding for IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ , IL-2r or for β 2-globulin from peripheral blood T cells obtained from 7 patients with PSS and 5 healthy individuals. Shown are representative results of ethidium bromide staining from one patient with PSS and one normal subject. Lanes 1 to 7: amplified β 2-globulin, IL-2, IL-2r, IL-4, IL-10, IL-13 and IFN- γ from a patient with PSS. Lanes 8 to 14: amplified β 2-globulin, IL-2, IL-2r, IL-4, IL-10, IL-13 and negative control from a normal subject.

positive for mRNA signal for IL-2r and for IFN- γ (data not shown). To more accurately quantify the IFN- γ , IL-10 and IL-13 gene expression in T cells from patients with PSS we measured the band intensities for the β 2-globulin mRNA amplified product from the undiluted RNA sample and graded dilutions of the same sample in those patients positive for IFN- γ , IL-10 and IL-13 mRNA. A representative experiment is shown in Figure 3. Results showed that a decrease in cytokine mRNA concentration led to a concomitant decrease in the β 2-globulin/cytokine ratio and that this ratio is directly related to cytokine mRNA concentrations.

DISCUSSION

Quantitative abnormalities of peripheral blood lymphocytes have been described in patients with PSS. In this study we confirm the presence of a decrease of the CD4+ population, as reported by others^{4,5,7}. We also describe an increase of the CD8+ cells. The mechanism responsible for the depletion of CD4+ lymphocytes and the increased number of CD8+ lympho-

cytes has not been cleared. This abnormality could result from the redistribution of CD4+ and CD8+ lymphocytes from peripheral blood to tissues as has been described in patients with scleroderma¹⁹. Both T cell subpopulations were found to be overexpressing the CD25 antigen. As this reflects T cell activation, we aimed to further examine the expression of T cell cytokines' mRNA in PSS patients and in controls. A significant finding was the presence of IFN- γ mRNA in unstimulated T lymphocytes from PSS patients. In previous reports examining IFN- γ mRNA expression in T cells from healthy adults, transcripts have only been detected following *in vitro* stimulation^{20,21}. Our finding that controls did not express IFN- γ mRNA in freshly isolated T cells is consistent with these reports. Thus, the presence of IFN- γ mRNA in T cells from PSS patients in the absence of stimulation *in vitro* might indicate that these cells have been previously activated *in vivo*. PSS is associated with a prominent T cell infiltration as well as proliferation in their salivary glands, therefore, activation of T cells could occur at this site with cells entering the circulation from lymph nodes via lymphatics or directly from involved salivary glands. Interestingly, constitutive expression

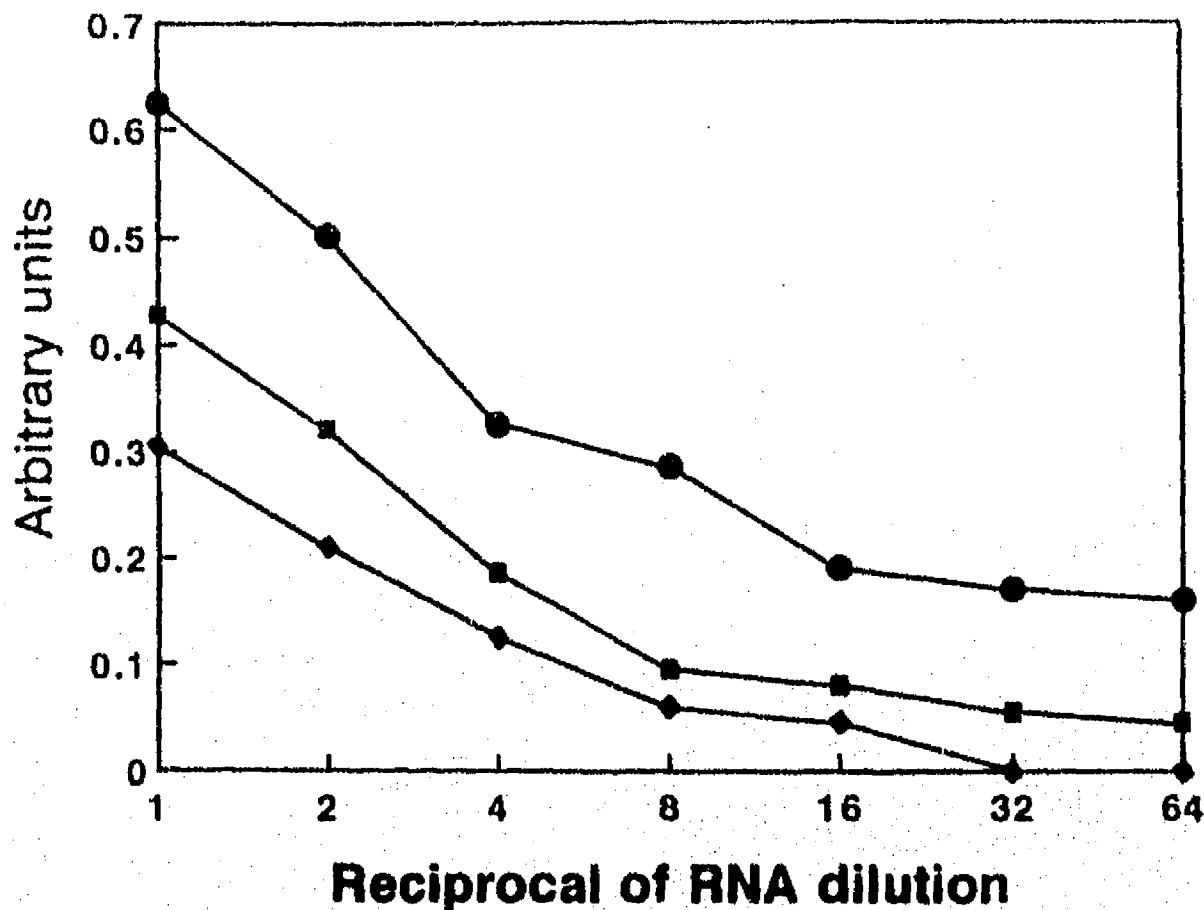


Figure 3 Semi-quantification of IL-10, IL-13 and IFN- γ mRNA in PSS patients. The relationship between the amount of IL-10, IL-13 and IFN- γ mRNAs and the IL-10, IL-13 and IFN- γ : β 2- μ globulin mRNA ratio was determined in peripheral blood T cells from patients with PSS. The band intensity for the β 2- μ globulin mRNA product of reverse transcription-polymerase chain reaction was determined from the undiluted RNA sample; that for IL-10 (■), IL-13 (◆), and IFN- γ (●) mRNA products was determined from serial dilutions of RNA samples. The ratio between the intensity of the IL-10, IL-13 and IFN- γ bands for a dilution and the intensity of the β 2- μ globulin band for the undiluted sample was determined. Results from one of three experiments.

of IFN- γ mRNA has also been documented in rheumatoid arthritis, a condition in which T cell activation has been postulated to contribute to the pathogenesis of the disease²². Spontaneous expression of IFN- γ mRNA was detected in freshly isolated mononuclear cells and T cells from synovial fluid and synovial tissue of patients with RA²³. In addition, patients with RA also have increased IFN- γ mRNA expression in unstimulated peripheral blood T cells²⁴.

The main control on the T cell proliferation subsides in the number of productive IL-2/IL-2r interactions which regulation is achieved mainly through the control of the α -chain (CD25)²⁵. Several factors regulate the transcription of the mRNA coding for this chain, including IL-2, TNF- α and IFN- γ . Our data suggest that production of IFN- γ (endogenous or virus-elicited) has an important role in controlling T cell proliferation of PSS patients, suggesting also that the induction of IL-2r is the mechanism by which IFN- γ induces T cell activation. These changes at the mRNA level were reflected at the cell surface, both in

CD4+ and CD8+ T cell subsets. Spontaneous expression of IL-10 and IL-13 mRNA was also found in T cells from PSS patients. We have previously shown increased gene expression and production of IL-10 in PSS as well as in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus¹³. It is important to point out that in these autoimmune diseases T lymphocytes contributed very little to IL-10 production, which originated mainly from B lymphocytes and monocytes¹³. Both, IL-10 and IL-13 are potent activators of B lymphocytes^{26,27}, the former being recognized as an important cytokine in B lymphocyte hyperactivity and in the development of autoimmunity. It remains to be demonstrated if IL-13 is mainly produced by B cells in autoimmune diseases as it has been recently described that both, normal and malignant human B cells do express IL-13 mRNA²⁸. Independent of their T or B lineage origin, IL-10 and IL-13 could play a role in the emergence of B cell lymphomas^{28,29,30} (which are common in the course of PSS^{2,31}), acting either in an autocrine or paracrine fashion.

Our results suggest that activated T cells in PSS may arise from disruption of homeostatic regulatory mechanisms, leading to production of T cell derived cytokines. The consequence of such a regulatory imbalance may permit the persistence of a putative infectious agent, or impair antigen specific T cell suppressive influences within the peripheral blood environment. Further investigation of the antagonism between proinflammatory and anti-inflammatory T cell secreted cytokines in PSS peripheral blood and in target organs should provide information relating to the pathogenesis and therapeutic potential of specific T cell induced cytokines in PSS.

Acknowledgement

Gilda M Villarreal was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT).

References

1. Skopouli F.N., Dorsos A.A., Papaioannu T. and Moutsopoulos H.M. Preliminary diagnostic criteria for Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* 1986; Suppl. 61: 22-25.
2. Fox R.I. and Kang H-I. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1992; 18: 517-538.
3. Youinou P., Mackenzie L., le Masson G., Papadopoulos N.M., Jouquan J., Pennec Y.L., Angelidis P., Katsikis P., Moutsopoulos H.M. and Lydyard P.M. CD5-expressing B lymphocytes in the blood and salivary glands of patients with Primary Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* 1988; 1: 185-194.
4. Aziz K.E., McCluskey P.J. and Wakefield D. Phenotypic and functional abnormalities in the peripheral blood T-cells of patients with Primary Sjögren's syndrome. *Cytometry* 1994; 18: 35-41.
5. Ichikawa Y., Shimizu H., Yoshida M. and Arimori S. Accessory Molecules expressed on the peripheral blood or synovial fluid T lymphocytes from patients with Sjögren's syndrome or rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1992; 10: 447-454.
6. Jamin C., Lamoignon A., Pennec L., Hirn M., Le Goff P. and Youinou P. Expression of CD5 and CD72 on T and B cells subsets in rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 92: 245-250.
7. Melendro E.L., Saldade C., Rivero S. and Alarcón-Segovia D. T cell subpopulations in the peripheral blood of patients with connective tissue diseases as determined by flow cytometry using monoclonal antibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1983; 27: 340-347.
8. Sato K., Miyasaka N., Yamaoka K., Okuda M., Yata J. and Nishioka K. Quantitative defect of CD4+2H4+ cells in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Arthritis. Rheum.* 1987; 30: 1407-1411.
9. Ichikawa Y., Shimizu M. and Arimori S. Activation antigens expressed on T-cells of the peripheral blood in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1990; 8: 243-249.
10. Ichikawa Y., Shimizu H., Yoshida M. and Arimori S. Activation of T cell subsets in the peripheral blood of patients with Sjögren's syndrome. Multicolor flow cytometric analysis. *Arthritis. Rheum.* 1990; 33: 1674-1681.
11. Struyf N.J., Snoeck H.W., Bridts C.H., De Clerck L.S. and Stevens W.J. Natural killer cell activity in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: stimulation with interferons and interleukin-2 and correlation with immune complexes. *Ann. Rheum. Dis.* 1990; 49: 690-693.
12. Gerli R., Bertotto A., Agea E., Lanfrancone L., Cernetti C., Spinozzi F. and Rambotti P. Basis for defective proliferation of peripheral blood T cells to anti-CD2 antibodies in primary Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 1990; 86: 1870-1877.
13. Llorente L., Richaud-Patin Y., Fior R., Alcocer-Varela J., Wijdenes J., Morel Fourrier B., Galanaud P. and Emilie D. *In vivo* production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 1647-1655.
14. Al-Janadi M., Al-Balla S., Al-Dalaan A., Raziuddin S. Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *J. Clin. Immunol.* 1993; 13: 58-67.
15. Centers for Disease Control: Guidelines for the Performance of CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus infection. *MMWR RR-8*. Vol. 42: 1992.
16. Loken M., Brosnan J., Bach B. and Ault K. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry* 1990; 11: 453-458.
17. Brain P., Gordon J. and Willets W. Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 1970; 6: 681-688.
18. Jondal M., Holm G. and Wigzell H. Surface markers on human T and B lymphocytes I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* 1972; 136: 207-215.
19. Roumm A.D., Whiteside T.L., Mesdger T.A. and Rodman A.P. Lymphocyte in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping and clinical correlations. *Arthritis. Rheum.* 1984; 27: 645-653.
20. Ferrarini M., Steen V., Mesdger T.A. and Whiteside T.L. Functional and phenotypic analysis of T lymphocytes cloned from the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1990; 79: 346-352.
21. Rutenfranz I., Kruse A. and Kirchner H. *In situ* hybridization of interferon-gamma producing peripheral blood mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.* 1991; 34: 169-178.
22. Maurer D., Felzman T., Holter W., Petera P., Smolen J. and Knapp W. Evidence for the presence of activated CD4 T cells with naive phenotype in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 1992; 87: 429-434.
23. Gauchat J.F., Gauchat D., De Weck A.L., Stadler B.M. Cytokine mRNA levels in antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* 1989; 19: 1079-1085.
24. Waalen K., Sloud M., Natvig J.B. and Forre O. Spontaneous *in vivo* gene transcription of interleukin-2, interleukin-3, interleukin-4, interleukin-6, interferon gamma, interleukin-2 receptor (CD25) and proto-oncogene c-myc by rheumatoid synovial T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 1992; 36: 865-873.
25. Smith K.A. and Cantrell D.A. Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1985; 82: 864-868.
26. Defrance T., Carayon P., Bilhain G., Guillemot J.C., Minty A., Caput D. and Ferrara P. Interleukin-13 is a B cell stimulating factor. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 135-143.
27. Rousset F., Garcia E., Defrance T., Peronne C., Vezzio D., Hsu R., Kastelein R., Moore K.W. and Banchereau J. Human and viral IL-10 are potent growth and differentiation factors for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1991; 89: 1890-1893.
28. Fior R., Vita N., Raphael M., Minty A., Maillol M.C.,

- Crevon M.C., Caput D., Biberfeld P., Ferrara P., Galanaud P. and Emilie D. Interleukin 13 gene expression by normal and malignant human B lymphocytes. *Blood* (in press).
29. Benjamin D, Knobloch T.J., Dayton M.A. Human B-cell interleukin-10: B cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood* 1992; 81: 1289-1298.
30. Emilie D., Touitou R., Raphael M., Penchman M., Devergne O., Rea D., Coumbraras J., Crevon M.C., Edelman L., Joab I. and Galanaud P. *In vivo* production of interleukin-10 by malignant cells in AIDS lymphomas. *Eur. J. Immunol.* 1992; 22: 2937-2942.
31. Talal N. and Bunim J. The development of malignant lymphoma in the course of Sjögren's syndrome. *Am. J. Med.* 1964; 36: 529-540.



Differential interleukin (IL)-10 and IL-13 gene expression in vivo in salivary glands and peripheral blood mononuclear cells from patients with primary Sjögren's syndrome

Gilda M. Villarreal, Jorge Alcocer-Varela, Luis Llorente*

Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México, D.F. c.p. 14000, México

Received 20 November 1995; accepted 20 December 1995

Abstract

Primary Sjögren's syndrome (PSS) is an autoimmune inflammatory disorder characterized by lymphocytic infiltration of exocrine glands, B cell hyperactivity and autoantibody production. The aim of this study was to determine the presence of IL-10 and IL-13 in this disease. We studied the IL-10 and IL-13 gene expression in vivo by peripheral blood mononuclear cells and minor salivary glands from PSS patients. We found a high expression of the IL-10 gene and its product by their peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as well as by their salivary glands. Peripheral blood B cells and monocytes were responsible for 89% of total IL-10 secretion. IL-13 gene expression was not observed in PBMC from either PSS patients or healthy controls, and was confined to PSS salivary glands. Our results suggest that IL-10 and IL-13 contribute to the pathogenesis of PSS and might explain the B cell abnormalities and the development of lymphoma observed in this autoimmune disease.

Keywords: Primary Sjögren's syndrome; Interleukin 10; Interleukin 13; Salivary gland

1. Introduction

Primary Sjögren's syndrome (PSS), a chronic inflammatory disorder, is characterized by diminished lacrimal and salivary gland secretion, resulting in keratoconjunctivitis sicca and xerostomia. The glandular insufficiency also affects other exocrine glands and is associated with a variety of autoimmune phenomena [1-3].

Patients with PSS exhibit two main types of immunoregulatory defects. The first of these is an abnormally active cellular immune system. This is evident by the intense inflammatory mononuclear cell infiltrate seen in the salivary glands of these patients. These infiltrates are made up predominantly of activated T

cells, however, B lymphocytes can be detected as well [1,4-6]. Interestingly, the mononuclear cell infiltrate is virtually devoid of macrophages [7]. The second immunoregulatory defect seen in patients with PSS is oligoclonal B cell activation. This results in hypergammaglobulinemia, elevated levels of immune complexes, and the production of autoantibodies [8]. Moreover, approximately 10% of patients with PSS develop non-Hodgkin's B cell lymphoma [9-11].

The presence of these abnormalities (B cell infiltrate in salivary glands, hypergammaglobulinemia, and development of B cell lymphoma) suggest that cytokines play an important role in the pathogenesis of PSS. Among the cytokines particularly involved in the amplification of the B cell activity are interleukin (IL)-10 and IL-13, which are able to stimulate the proliferation and differentiation of B lymphocytes [12-15].

This study was undertaken to determine whether IL-10 and IL-13 are overproduced in vivo by patients with PSS in both peripheral blood mononuclear cells and salivary glands.

* Corresponding author. Fax: +52 5 5712096; E-mail: jalco-
cee@mail.maii.conacyt.mx

2. Materials and methods

2.1. Patients

Twenty patients (19 females and one male) with PSS and with no evidence of infection were studied. All patients fulfilled the criteria for the diagnosis of PSS [16]. Fifteen healthy volunteers were studied as controls.

Salivary gland biopsies from seven of the above patients with PSS, and from three controls, were obtained, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C . The three biopsies we studied as controls were recruited from maxillofacial surgery patients with no known autoimmune disease based on clinical and histological criteria. All patients and controls were informed about the objectives and methods of the study and gave their consent.

2.2. Purification and cultures of PBMC

PBMC were isolated on Hystopaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) by gradient centrifugation. After two washings cells were enumerated and pellets of 10 million cells were immediately frozen at -70°C . In some experiments, cell subpopulations were purified as follows: PBMC were cultured for 3 h on plastic petri dishes. Adherent cells were recovered using a rubber policeman after 1 h at 4°C in PBS containing EDTA. This population contained more than 80% CD14⁺ cells as determined by flow cytometry analysis. T and B cells were isolated from the non-adherent cell population: the non-adherent cells were rosetted with 2-aminoethylisothiuronium bromide (AET) (Sigma)-treated sheep red blood cells (SRBC). AET-SRBC rosetting cells (T cells) were more than 95% CD3⁺ cells. B cell preparations contained more than 90% CD19⁺ cells. One million unfractionated PBMC or cell subpopulations were cultured in 1 ml of 10% gamma globulin-free fetal calf serum (Gibco-BRL, Gaithersburg, MI) containing RPMI 1640 media for 24 h. The concentration of IL-10 and IL-13 was then measured in the supernatant by ELISA.

2.3. Detection of IL-10 and IL-13 by coupled reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total cellular RNA was extracted from frozen cells and salivary glands using the Trizol technique according to the manufacturer's recommendation (Gibco-BRL). Purified RNA was treated with 10 units of RNase-free DNase I (Gibco-BRL) at 37°C for 30 min, then with phenol, chloroform/isoamyl alcohol and finally precipitated with ethanol. cDNA synthesis was performed using 1 μg of RNA that was incubated with 50 U of Moloney leukemia virus reverse transcriptase

(Gibco-BRL) in the presence of 2.5 μM oligo [d(T)₁₂₋₁₈] (Gibco-BRL), and 0.5 mM of each of the four deoxynucleotide triphosphates. The resulting cDNA was divided into three aliquots. For PCR amplification of the cDNA products, 3 μM of the sense and anti-sense primers (β -actin: 5'-GGGTCAGAAGGATTCC-TATG-3', and 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'; IL10: 5'-AAATTTGGTTCTAGGCCGGG-3', and 5'-GAGTACAGGGGCATGATATC-3'; IL13: 5'-GAGTGTGTTGTACCCGTTG-3', and 5'-TACTCGTTGGCTGAGAGCTG-3'), and 2 units of Taq polymerase (Perkin-Elmer Corporation, Branchburg, NJ) were added to the reaction mixture to each of the cDNA aliquots. Amplification was at 94°C for 5 min, 53°C for 1 min, and 72°C for 1.5 min for 1 cycle; at 94°C for 1 min, 53°C for 1 min, and 72°C for 1.5 min for 33 cycles; and for one final cycle at 94°C for 1 min, 53°C for 1 min and 72°C for 7 min. The PCR products were electrophoresed in 0.9% agarose gels containing 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide. All samples were screened in parallel for β -actin. Negative controls included samples in which the addition of RT was omitted during the processing, and samples without cDNA during the PCR reaction. Gels were photographed using a Polaroid land film (Type 665). Polaroid negatives were used for densitometric analysis. The intensity of the bands was estimated and all values were normalized to the β -actin-positive control included in each PCR determination to a value of 1. In some samples, Southern blot analysis verified that the amplified products were recognized by internal IL-10 and IL-13 oligonucleotides (5'-CATCGATTTCTCCCTGTGA-3' and 5'-TGGGGAAGACTGTGGCT-3', respectively).

2.4. ELISA assay for IL-10 and IL-13

IL-10 levels were measured by immunoreactivity in a double sandwich ELISA format using a commercially available kit (Innotest, Besançon, France). The sensitivity of this ELISA is 3 pg/ml, and it does not recognize the BCRF1 gene product. IL-13 levels were also determined by ELISA. Anti-IL-13 monoclonal antibody (Mab) B-B13 was used as the coating antibody, and anti-IL-13 Mab B-P6 as the tracer antibody. The sensitivity of this ELISA is 6 pg/ml. Each well was coated overnight with 100 μl of Mab B-B13 (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) at 4°C . The plate was washed four times with PBS, incubated with 250 $\mu\text{l}/\text{well}$ of blocking buffer (20% sucrose in 0.1 M Tris, pH 7.7) for 2 h at 20°C , and then the buffer was aspirated and discarded. To each well was added 100 μl of standards and samples diluted in sample buffer (PBS, 1% bovine serum albumin (BSA), 0.1% thimerosal) and 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ of biotinylated B-P6 (500 ng/ml in PBS, 1% BSA, 3% normal mouse serum, 0.1% thimerosal). The plates were incubated for 2 h at 37°C . The wells were washed 4 times between each

subsequent step. One hundred microliters of streptavidin peroxidase (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in sample buffer; Sigma) was added to each well and incubated for 45 min at 20°C. After the last wash, 100 μl of 0.4 mg/ml *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) was added to each well, and the plates were incubated for 30 min at 20°C. The enzyme reaction was stopped by adding 100 μl /well of 1 N H_2SO_4 . Optical densities were measured at 492 nm.

3. Results.

3.1. Expression of the IL-10 and IL-13 genes by PBMC from patients with PSS

PBMC from 12 PSS patients were tested by RT-PCR for the presence of IL-10 and IL-13 mRNA. All of them scored positive for IL-10. The specificity of the signal obtained for IL-10 was confirmed by hybridizing the amplified product with an internal probe (data not shown). Of the 12 control samples none scored positive for IL-10. On the other hand, an extremely faint band corresponding to the 253-bp of IL-13 message was detected in ten patients and eight controls. In all controls and PSS samples, the amplified product for β -actin was detected (data not shown).

3.2. In vitro production of IL-10 and IL-13 by PBMC of PSS patients

We showed that the increased IL-10 gene expression was associated with a parallel production of IL-10. PBMC from 20 PSS patients were cultured for 24 h. The concentration of IL-10 was then measured in the culture supernatant using an ELISA assay. Results from PSS patients were compared with those from 15 normal subjects. IL-10 concentration was on average 52 times higher in samples from PSS patients than from controls (Fig. 1A). As we found almost undetectable levels of IL-13 gene expression in PSS patients and in normal subjects, we searched for IL-13 production in 24-h supernatants by ELISA. Only three patients had concentrations of IL-13 above the threshold limit of the assay (62, 52 and 37 pg/ml, respectively).

3.3. Production of IL-10 by mononuclear cell subpopulations

To determine which cell subpopulation was responsible for the increased production of IL-10 in PSS, we studied IL-10 production by different subpopulations. Cell subpopulations from 14 PSS patients were isolated, and their spontaneous in vitro IL-10 production was assessed. The contribution of T lymphocytes to the total production of IL-10 was only 11%. Both mono-

cytes and B cells were responsible for most of the production of IL-10 production in PSS (Fig. 1B).

3.4. Expression of the IL-10 and IL-13 genes by salivary glands from PSS patients

Spontaneous expression of the IL-10 and IL-13 genes were evaluated by RT-PCR studies on freshly isolated RNA from salivary gland homogenates. This analysis was performed in parallel on salivary gland homogenates from normal biopsies. Following amplification a strong band for IL-10 was detected in all seven samples from PSS patients, and IL-13 was detected in five of them. A faint band for IL-10 was detected in one control, and no band was detected for IL-13 in the control specimens (Table 1). A representative experiment is shown in Fig. 2.

4. Discussion.

This study shows that the IL-10, but not the IL-13 gene is expressed in vivo and produced at higher levels in PBMC from patients with PSS than from controls. These results were obtained by studying a large population of PSS patients and evidenced by assaying mRNA from uncultured PBMC by RT-PCR, and by screening PBMC supernatants – after short in vitro incubation without deliberate stimulation – by ELISA. To deter-

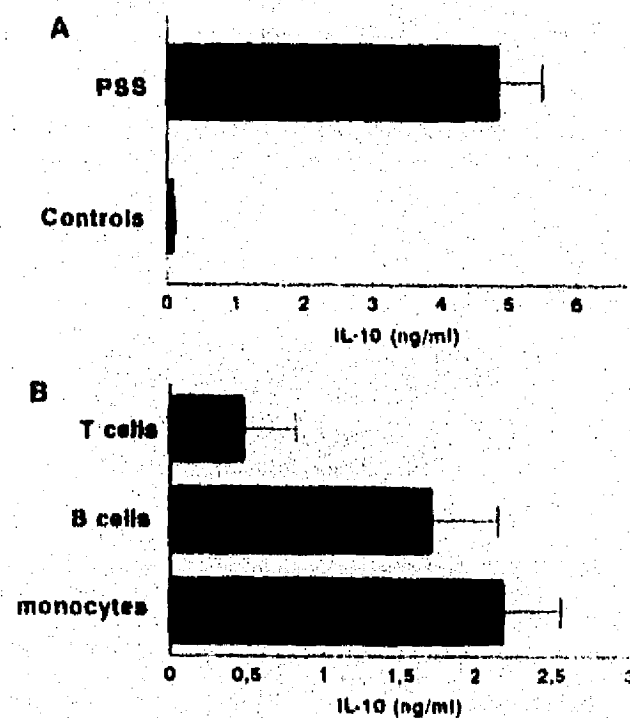


Fig. 1. IL-10 production by PBMC from 20 PSS patients and 15 controls (A) and by mononuclear cell subsets in 15 PSS patients (B).

Table 1
Semiquantitation of IL-10 and IL-13 gene expression in salivary gland biopsy specimens in patients and controls

	IL-10	IL-13
Patient 1	0.27*	0.28
Patient 2	0.77	0.30
Patient 3	0.30	0.30
Patient 4	1.00	1.08
Patient 5	1.06	0.00
Patient 6	1.13	0.59
Patient 7	0.30	0.00
Control 1	0.17	0.00
Control 2	0.00	0.00
Control 3	0.00	0.00

*For each sample the ratio of the band intensity between β -actin and cytokines was calculated as described in Methods.

mine which cell subpopulation was responsible for the increased production of IL-10 in PSS, we studied IL-10 production by different subpopulations. Peripheral blood cell subpopulations from 14 PSS patients were isolated, and their spontaneous *in vitro* IL-10 production was assessed. In every case the T cell fraction produced a detectable amount of IL-10. However the level of production accounted for only 11% of that produced by unfractionated PBMC. Both B cells and monocytes produce large amounts of IL-10 in all cases. Previously, sustained production of IL-10 has been observed in PBMC from patients with PSS in which the contribution of T lymphocyte production of IL-10 was much lower than that of B lymphocytes and monocytes, which were responsible for most of it [17]. In this regard, the immunological imbalance observed in PSS patients, i.e., B cell hyperactivity, could be privileged in such a way that B cells can be driven to differentiate by IL-10, with the resulting hypergammaglobulinemia and autoantibody production. Our results extend these observations and further support the important role that IL-10 might have in the polyclonal B cell hyperactivity associated with PSS.



Fig. 2. Cytokine mRNA amplification in salivary gland biopsies from PSS patients. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to amplify mRNA coding for IL-10, IL-13 and for β -actin from labial salivary gland biopsies obtained from seven patients with PSS and from three controls. Representative results from ethidium bromide staining from one patient with PSS and one normal control are shown. Lanes 1-3: β -actin, IL-10 and IL-13, respectively, from a patient with PSS. Lanes 4-7: β -actin, IL-10, IL-13 and negative control, respectively, from a normal subject.

We also analyzed IL-10 and IL-13 gene expression in seven salivary gland homogenates from PSS patients and in three histologically normal salivary glands. All PSS salivary glands tested were positive for IL-10 gene expression, contrasting with the low or undetectable gene expression in the control specimens. Five PSS biopsies scored positive for IL-13 but no message was found in the control samples. A previous study using quantitative PCR has shown that CD4+ T cells eluted from PSS salivary glands express cytokine mRNAs for IL-2, IFN- γ and IL-10 but not for IL-4 and IL-5 [18]. In contrast, Boumba et al. using *in situ* hybridization and immunohistochemistry found IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6 but not IL-10 mRNA in the mononuclear cells involved in the labial salivary glands of patients with PSS [19]. Furthermore, IL-4 mRNA was detected in CD45RA T cells in patients with a mild and early histopathological lesion. These apparently conflicting results could be explained by the different methodological approaches. Both reports however, found that salivary gland epithelial cells produce pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-6, TNF- α) suggesting that epithelial cells may also play a role in the pathogenesis of the lesion in PSS. In regard to IL-10 gene expression, our results support the former report, however, it must be stated that our study was carried out with total RNA extracted from salivary gland biopsies and that we did not attempt to determine which cell was expressing the specific mRNA for the two cytokines tested.

Although initially reported as a cytokine produced by Th2 lymphocytes [20], IL-10 has subsequently been shown to also be produced by Th1 cells, B cells and macrophages in humans [21-23]. Similarly, IL-13 was originally described as a cytokine produced by Th2 lymphocytes [24] and recently it has been shown that the IL-13 gene can be expressed by stimulated normal peripheral blood B cells [25]. The salivary gland is a site of latency for a number of viruses including the herpesviruses, particularly EBV [26,27]. It has been reported that IL-10 can promote the *in vitro* proliferation of EBV transformed B lymphocytes [28] and that the IL-13 gene can be expressed by malignant as well as by EBV transformed B cells [25]. There have been case reports of PSS developing after EBV infection [29] and a study found an increased tendency for the spontaneous outgrowth of B lymphoblastoid cell lines from PBMC from patients with PSS, suggesting defective T cell mediated control of EBV infected cells [30]. IL-10 and IL-13 produced either by T cells and/or by B cells in salivary glands of PSS patients, could be acting on normal or infected B lymphocytes in a paracrine or an autocrine fashion inducing them to proliferate, produce immunoglobulins, and particularly undergo increased risk of lymphomagenesis. The precise role of both cytokines on the abnormal behaviour of B lymphocytes in PSS, either towards hyperactivity or to malignancy, remains to be determined.

To our knowledge, this is the first demonstration of IL-13 expression *in vivo* in patients with PSS. Comparison of the production of IL-10 and IL-13 in PBMC and salivary glands from patients with PSS highlights the singularities of the immune reaction developed systemically and at the site of tissue damage. Regarding the latter, it is evident that not a single cytokine but a network of cytokines (produced by both, the salivary gland and the mononuclear cell infiltrate) controls the inflammatory state seen in PSS. Further studies are thus required to determine the source and contribution of these cytokines to the pathogenesis of PSS including the development of non-Hodgkin's lymphoma.

Acknowledgements

Gilda M. Villarreal was supported by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT). We thank Dr. Dominique Emilie for the reagents provided for the IL-13 ELISA assay.

References

- [1] Price, E.J. and Venables, P.J.W. (1995) *Semin. Arthr. Rheum.* 25, 117.
- [2] Fox, R.I. and Kang, H.I. (1992) *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 18, 517.
- [3] Constantopoulos, S.H. and Moutsopoulos, H.M. (1987) in: Sjögren's Syndrome. Clinical and Immunological Aspects. (N. Talal, H.M. Moutsopoulos and S.S. Kassan, Eds.) pp. 83-87, Springer/Verlag, London.
- [4] Coll, J., Tomás, S., Vilella, R. and Corominas, J. (1995) *J. Rheumatol.* 22, 1488.
- [5] Lindahl, G., Hedfors, E., Kloreskog, L. and Forsum, U. (1985) *Clin. Exp. Immunol.* 61, 475.
- [6] Moutsopoulos, H.M., Hooks, J.J., Chan, C.C., Dalavanga, Y.A., Skopouli, F.N. and Detrick, B. (1986) *Ann. Rheum. Dis.* 45, 677.
- [7] Daniels, T.E. (1984) *Arthr. Rheum.* 27, 147.
- [8] Alsbaugh, M.A., Talal, N. and Tan, E.M. (1986) *Arthr. Rheum.* 19, 216.
- [9] Janin, A., Morel, P., Quiquandon, I., Farre, I., Hatron, P.Y., Bauters, F. and Gosselin, B. (1992) *Clin. Exp. Rheumatol.* 10, 565.
- [10] Sela, O. and Shoenfeld, Y. (1988) *Semin. Arthr. Rheum.* 18, 77.
- [11] Talal, N. and Bunim, J. (1964) *Am. J. Med.* 36, 529.
- [12] Defrance, T., Carayon, P., Bilhain, G., Guillemot, J.C., Minty, A., Caput, D. and Ferrara, P. (1994) *J. Exp. Med.* 179, 135.
- [13] Punnonen, J. and de Vries, J.E. (1994) *J. Immunol.* 152, 1094.
- [14] Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, D., Hsu, R., Kastelein, R., Moore, K.W. and Banchereau, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1890.
- [15] Zurawski, G. and de Vries, J.E. (1994) *Immunol. Today* 15, 19.
- [16] Skopouli, F.N., Dorsos, A.A., Papaloannu, T. and Moutsopoulos, H.M. (1986) *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 61, 22.
- [17] Llorente, L., Richaud-Patin, Y., Fior, R., Alexeev-Varela, J., Wijdenes, J., Morel-Fourrier, B., Galanaud, P. and Emilie, D. (1994) *Arthr. Rheum.* 37, 1647.
- [18] Fox, R.I., Kang, H.-I., Ando, D., Abrams, J. and Pisa, E. (1994) *J. Immunol.* 152, 5532.
- [19] Bounba, D., Skopouli, F.N. and Moutsopoulos, H.M. (1995) *Br. J. Rheumatol.* 34, 326.
- [20] Fiorentino, D.F., Bond, M.W. and Mosman, T. (1989) *J. Exp. Med.* 170, 2081.
- [21] de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G. and de Vries, J.E. (1991) *J. Exp. Med.* 174, 1209.
- [22] Burdin, N., Perone, C., Banchereau, J. and Rousset, F. (1993) *J. Exp. Med.* 177, 295.
- [23] Yssel, H., de Waal Malefyt, R., Roncarolo, M.G., Abrams, J.S., Lahesmaa, R., Spits, H. and de Vries, J.E. (1992) *J. Immunol.* 149, 2378.
- [24] Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatris, P., Liauzun, P., Miloux, B., Minty, C., Casellas, P., Loison, G., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P. and Caput, D. (1993) *Nature* 362, 248.
- [25] Fior, R., Vita, N., Raphael, M., Minty, A., Maillot, M.C., Crevon, M.C., Caput, D., Biberfeld, P., Ferrara, P., Galanaud, P. and Emilie, D. (1994) *Eur. Cytokine Netw.* 5, 593.
- [26] Flescher, E. and Talal, N. (1991) *Am. J. Med.* 90, 283.
- [27] Fox, R.I., Pearson, G. and Vaughan, J.H. (1986) *J. Immunol.* 137, 3162.
- [28] Whittingham, S., McNeillage, J. and Mackay, I.R. (1985) *Ann. Int. Med.* 102,490.
- [29] Yamaoka, K., Miyasaka, N. and Yamamoto, K. (1988) *Arthr. Rheum.* 31, 1014.
- [30] Pablos, J.L., Carreira, P.E., Morillas, L., Montalvo, G., Ballester, C. and Gómez-Reino, J.J. (1994) *Arthr. Rheum.* 37, 1441.