

29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

"EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA EXPRESION DE LA CADENA α DEL RECEPTOR DE INTERLEUCINA-2 Y EL LIGANDO DE CD40 EN UN LINFOMA T Y EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: HUGO ERASTO HERRERA HIDALGO



MEXICO, D. F.

1998

25/06/18

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).

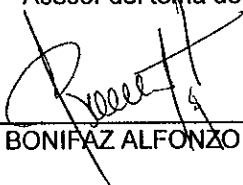
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: HERNÁNDEZ MONTES HOMERO
VOCAL: RION ARRIOLA RAFAEL
SECRETARIO: BONIFAZ ALFONZO LAURA CECILIA
1er SUPLENTE: MONTIEL AGUIRRE JESÚS FERNANDO
2o SUPLENTE: GIRAL BARNÉS CARMEN

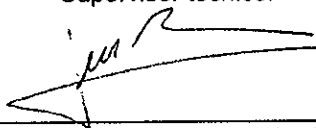
Sitio donde se desarrolló el tema: Unidad de Investigación Médica en Reumatología e Inmunobiología. Centro Médico Nacional S. XXI. Hospital de Especialidades. México D.F.

Asesor del tema de tesis:



M. en C. BONIFAZ ALFONZO LAURA CECILIA

Supervisor técnico:



Dr. Moreno Rodriguez José

Sustentante:



Herrera Hidalgo Hugo Erasto

DEDICATORIAS

A todos mis hermanos

A todos mis sobrinos, por su la alegría y su inocencia

A mis amigos por ser parte de mi vida y mis sueños, y porque han estado en las buenas y en las malas:

A Mitch, Tavo y Fher L., por ser los mejores...

A Dulce M., M. Vanessa y Chela C., por su agradable compañía.

A todos los integrantes de lo que alguna vez fué la escuelita : un lugar en donde nos olvidábamos de las presiones estudiantiles

A todos aquellos para quienes este logro es importante.

AGRADECIMIENTOS :

A mis padres Enriqueta H. y Erasto H. por su amor, apoyo y libertad,
Gracias por haber confiado siempre en mí.

A mis asesores de tesis : M. en C. Laura B. y Dr. José Moreno, por el
inigualable aprendizaje científico y humano que me enseñaron.

A la UNAM, por brindarme la oportunidad de seguir desarrollándome
intelectualmente.

A toda la UIM en Reumatología e Inmunobiología por ser uno de los
lugares más cálidos y agradables en la investigación.

A todos los que hicieron posible este logro.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

página

INTRODUCCIÓN.....1

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1.- Eventos en la activación de linfocitos T.....	3
2.2.- Transducción de señales.....	5
2.3.- Coestimulación y CD28.....	7
2.4.- Activación no fisiológica.....	9
2.5.- Activación de linfocitos B.....	11
2.6.- El receptor de IL-2.....	12
2.7.- La interacción CD40-CD40L.....	14
2.8.- Glucocorticoides e inmunosupresión.....	16

CAPÍTULO 3

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....20

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....21

CAPÍTULO 5

DISEÑO EXPERIMENTAL.....22

CAPÍTULO 6

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
--------------------------------	-----------

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1.- EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN EL CAMBIO DE ISOTIPO DE LAS INMUNOGLOBULINAS	
7.1.1.- Pureza de linfocitos T.....	31
7.1.2.- Efecto de la dexametasona en la producción de IL-2.....	32
7.1.3.- Pureza de linfocitos B.....	34
7.1.4.- Efecto de la dexametasona en la producción de Igs.....	34
7.2.- EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA EXPRESIÓN DEL CD40L Y EL IL-2Rα	
7.2.1.- Caracterización de las células Jurkat.....	37
7.2.2.- Efecto de la dexametasona en la producción de IL-2 en células Jurkat.....	38
7.2.3.- Cinética de expresión del CD40L y el IL2R α en células Jurkat.....	39
7.2.4.-Efecto de la dexametasona en la expresión del CD40L y el IL2R α en células Jurkat.....	41
7.2.5.- Cinética de expresión del CD40L y el IL2R α en linfocitos T.....	44
7.2.6.- Efecto de la dexametasona en la expresión del CD40L y el IL2R α en LT de sangre periférica.....	46
7.3.- EFECTO DE LA DEXAMETASONA EN LA INTERACCIÓN CD40-CD40L	
7.3.1.- Efecto de anti-CD40L en cocultivos LT-LB.....	48
7.3.2.- Efecto de CD40 quimérica en la activación de LB vía CD40.....	50

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN.....53

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES.....59

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA.....60

ABREVIATURAS

Ac(s)	Anticuerpo(s)
Ag(s)	Antígeno(s)
BCR	Receptor de linfocitos B
CPA(s)	Célula(s) Presentadora(s) de Antígeno
DGA	Diacilglicerol
c-Jun	(protooncogen c- Jun) un componente de AP-1
c-Fos	(Protooncogen c-Fos) un componente de AP-1
Ca ²⁺	Calcio
C3	Un componente del complemento
CD	Marcadores de Diferenciación de poblaciones celulares
CD3	Complejo asociado al TCR
CD3 γ	Cadena gama de CD3
CD3 δ	Cadena delta de CD3
CD3 ϵ	Cadena épsilon de CD3
CD4	Correceptor para MHC II
CD8	Correceptor para MHC I
CD19	Molécula coestimuladora CD19 en LB
CD20	Molécula coestimuladora CD20 en LB
CD25	Receptor de Interleucina-2
CD28	Molécula coestimuladora CD28
CD40	Molécula coestimuladora CD40
CD40L	Ligando de CD40
CD45	Proteína Tirosina Fosfatasa CD45
CD80 y CD86	Glucoproteínas en CPAs responsables de la coestimulación por CD28 y CTLA4
cyclin E	Proteína "ciclina E" reguladora del ciclo celular
Fas	Molécula que participa en regulación negativa
FC γ RIIb1	Molécula de regulación negativa que une Fc de IgG1
fyn	Un miembro de la familia src

FasL	Ligando de Fas
IFN	Interferón
Ick	Un miembro de la familia src
ICAM	Molécula de Adhesión Intracelular.
IκB	Inhibidor del NF-κB
IL	Interleucina
IL-2R α	Receptor de IL-2 (cadena alfa)
IL-2R β	Receptor de IL-2 (cadena beta)
IL-2R γ	Receptor de IL-2 (cadena gama)
JNK1	Cinasa c-Jun 1
JNK2	Cinasa c-Jun 2
JAK1	Cinasa Janus 1
JAK3	Cinasa Janus 3
LT	Linfocitos T
LB	Linfocitos B
LFA	Antígeno Asociado a Funciones Linfocitarias
mAc	Anticuerpo monoclonal
MAPK	Proteín Cinasa Activada por Mitógeno
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NF-AT	Factor Nuclear de Linfocitos T Activados
NF-κB	Factor Nuclear κB
NK	Células Asesinas Naturales
PLC	Fosfolipasa C
PKC	Proteín Cinasa C
PI3	Trifosfato de inositol 1,4
PI-3 Kinase	Cinasa Fosfoinositol-3
PMA	Forbol-Miristato-Acetato
ras	Una proteína que úne GTP
SHP	Proteín-Tirosín-fosfatas conteniendo dominios SH ₂
SHC	Proteína que contiene dominios SH ₂
slg	Inmunoglobulina de superficie

STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3
STAT5	Transductor de señales y activador de la transcripción 5
TCR	Receptor de linfocitos T
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
ZAP-70	Proteín-Tirosín-Cinasa asociada a las cadenas zeta del CD3
ζ	Cadena zeta del CD3
δ	Cadena delta del CD3
η	Cadena eta del CD3

1.- INTRODUCCIÓN

El sistema inmune utiliza un sistema de vigilancia químico altamente organizado para reconocer y combatir un impresionante número de sustancias extrañas (antígenos). Esos antígenos (Ags) extraños son detectados por receptores antígeno-específicos y llevados a los linfocitos los cuáles son entonces activados y con ello se desencadena una respuesta inmune. Los linfocitos pueden ser divididos en células derivadas del timo (linfocitos T) que pueden actuar combatiendo patógenos intracelulares (inmunidad celular) y las células derivadas de la médula ósea (Linfocitos B) que protegen contra patógenos extracelulares (inmunidad humoral) ¹.

Existen dos tipos de linfocitos T (LT), los LT citotóxicos capaces de combatir células infectadas, y los LT inductores, los cuáles ayudan a los linfocitos B (LB) a combatir las infecciones mediante la provisión de citocinas específicas. Los LB antígeno-específicos maduros responden a los antígenos proliferando y diferenciándose a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Todos éstos procesos anteriores se alcanzan sólo si los LT son activados y si éstos ejercen su función efectora sobre sus células blanco, p. ej. en LB. La activación de LT requiere de la estimulación coordinada de proteínas tirosina-quinasas y un aumento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular, lo cual induce, entre otros eventos, la expresión de la cadena α del receptor de Interleucina 2 (IL-2R α) y el ligando de CD40 (CD40L).

El reconocimiento de IL-2 por células que expresan el IL-2R, regula su crecimiento y diferenciación. Uno de los efectos principales que ejerce CD40L sobre LB a través de la interacción con CD40, es el cambio de isotipo de inmunoglobulinas (IgM a IgG) ¹⁻³.

Durante su ontogenia, las células del sistema inmune desarrollan, en forma aleatoria la capacidad para responder contra los Ags extraños o propios. La mayoría de los LT y LB que reconocen a los Ags propios son eliminados inmediatamente después de su generación o inactivados en la periferia (tolerancia inmunológica). El fenómeno mediante el cual no existe tolerancia hacia lo propio se conoce como autoinmunidad.

En la inmunosupresión, en general, se inhibe la respuesta inmune mediante el uso de agentes inmunosupresores. Dentro de los fármacos inmunosupresores más potentes se encuentran los glucocorticoides y dentro de sus acciones antiinflamatorias incluyen la inhibición de la producción de diversas citocinas lo que resulta en un brusco abatimiento de la respuesta inmune tanto humoral como celular. Además, un efecto conocido pero poco estudiado de los glucocorticoides es la supresión de la producción de Igs ^{4,5}.

En el laboratorio de investigación en Inmunobiología del CMN SXXI, una de las líneas de investigación es el estudio de la interacción CD40-CD40L en la patogenia de las enfermedades autoinmunes, principalmente del lupus eritematoso sistémico (LES). Una de las manifestaciones más características de esta enfermedad, es la formación

de anticuerpos (Acs) autoreactivos anti-nucleares (DNA, histonas etc.) principalmente del isotipo IgG. Se ha observado que en los pacientes con LES, el tratamiento con glucocorticoides disminuye la agresividad de la enfermedad y la concentración sérica de Igs.

Por lo que el objetivo principal de esta tesis es determinar el mecanismo por el cual los glucocorticoides afectan la interacción CD40-CD40L lo que resulta en la supresión de la producción de las Igs y en el cambio de isotipo.

2. ANTECEDENTES

2.1.- EVENTOS EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

Los linfocitos T juegan un papel central en la respuesta inmune específica hacia Antígenos proteínicos. Para iniciar una respuesta inmune antígeno-específica, es necesario que una célula presentadora de antígenos (CPA) capte un Ag proteínico, lo internalice, lo procese y presente péptidos derivados del mismo (determinantes antigénicos) en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La activación antígeno-específica de LT requiere de tres eventos, la adhesión, el reconocimiento y la coestimulación. En la adhesión los LT interactúan con las CPAs a través de ligandos y receptores expresados en la superficie de ambas células. Dentro de éstos ligandos y receptores se encuentran como ejemplos: LFA-3 en una CPA interactuando con CD2 en LT, ICAM-1 con LFA-1, etc. Como consecuencia de esta unión, la fuerza de adhesión entre la CPA y el LT se incrementa por la participación de muchas de estas moléculas llamadas de adhesión. Esta propiedad asegura que el LT y la CPA permanecerán unidas una a otra lo suficiente para permitir otras interacciones funcionales necesarias o para asegurar que el LT ejerza su función efectora sobre la CPA ^{2,6}. En el reconocimiento, los LT reconocen a través de su receptor (TCR), antígenos peptídicos asociados a las moléculas del MHC ^{2,7}.

Además de la interacción del complejo MHC-Ag con el TCR, para el inicio de la activación del linfocito T, se requiere de 5 moléculas más que se asocian de manera no covalente con el TCR. Tres de esas cinco son las cadenas invariantes γ , δ y ϵ del CD3, y a este complejo TCR-CD3 se asocian las cadenas individuales homodiméricas ζ - ζ y las heterodiméricas ζ - η . A este complejo TCR-CD3 se encuentran también asociadas las moléculas correceptoras CD4 o CD8 y al cual puede asociarse la tirosina-fosfatasa CD45 después del reconocimiento antigénico⁸. A la interacción de ligandos con receptores que genera señales intracelulares, que no son antígeno-específicas ni restringidas por el MHC pero que son necesarias tanto para la secreción de citocinas como para la proliferación celular y la función efectora, se le denomina coestimulación⁹. Las moléculas accesorias se han clasificado entre aquellas mediadas de adhesión y aquellas que transducen señales, sin embargo esto no es del todo absoluto, ya que las primeras pueden también transducir señales y viceversa.

2.2.- TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.

La fosforilación como la desfosforilación son mecanismos básicos en las cascadas de eventos intracelulares que inician la activación del LT. Así, después del reconocimiento del complejo antígeno-MHC por el TCR, CD45 desfosforila a las cinasas $p59^{lyn}$ y $p56^{lck}$, las cuáles se encuentran asociadas a diferentes componentes del complejo TCR (CD3, CD4 o CD8 y la cadena ζ), activándolas para que éstas

puedan fosforilar los residuos abundantes en tirosina de las cadenas ζ . La fosforilación de las cadenas ζ permite la unión de la cinasa ZAP-70 cuya fosforilación por Fyn o Lck le permite ejercer su actividad sobre Ras y la fosfolipasa C- γ (PLC- γ). Esta última escinde el fosfatidilinositol a diacilglicerol (DAG) y trifosfato de inositol (IP₃). El DAG activa a la proteína-cinasa C (PKC) la cuál activa al factor de transcripción NF- κ B. El IP₃ incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular activando a la fosfatasa calcineurina que a su vez activa al factor de transcripción NFAT (Figura 1). Ras activa una cascada de cinasas que induce y activa a Fos, un componente del factor transcripcional AP-1 (compuesto de las proteínas fos y jun). Una vez que los factores de transcripción son activados y translocados al núcleo, se unen a los promotores de genes de linfocinas que aumentan o disminuyen la síntesis de citocinas, la expresión de los receptores de citocinas y la proliferación celular ^{1,2,3,7,8}.

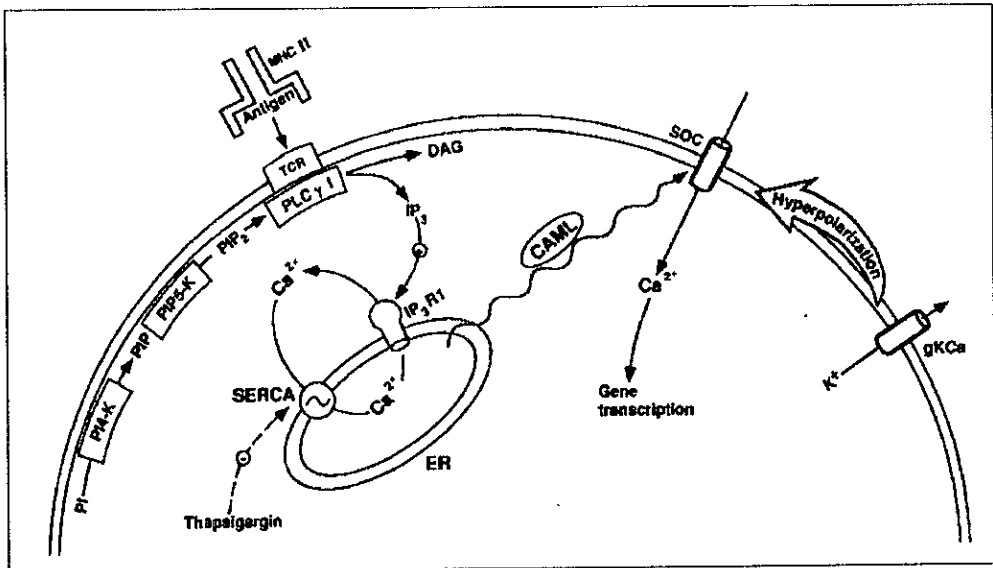


FIGURA 1.- Señalización de calcio inducida por el Antígeno. El TCR responde al complejo MCH-Ag a través de la estimulación de la PLCγ1 para generar IP3, el cual al unirse a su receptor libera Ca²⁺ del retículo endoplásmico. Si existen reservas vacías de Ca²⁺, pueden generarse señales que abren canales de calcio en la membrana plasmática. La apertura de dichos canales se ve facilitada por la hiperpolarización mantenida por los canales de K⁺ (tomado de Berridge M. ¹),

2.3.- COESTIMULACIÓN Y CD28

La transducción de señales generada a través de la interacción del complejo TCR con el Ag en el contexto del MHC, no es suficiente para la activación de LT, por lo que se requiere la presencia de señales coestimuladoras. La coestimulación es un evento necesario para la inducción de la secreción de citocinas, para la proliferación celular y para ejercer la función efectora. Si la señal coestimuladora no ocurre, los LT entran en estado de no respuesta denominado anergia ¹⁰. Dentro de las interacciones

coestimuladoras se encuentran CD28 con CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2); CD40 con CD40L y CD27 con CD70. CD28 es una molécula coestimuladora presente en el LT, es una glucoproteína homodimérica de 90 kDa y su expresión puede ser aumentada con el uso de los ésteres de forbol (PMA) o anticuerpos anti-CD3 (p. ej. OKT3). Se ha reportado que los anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CD28 incrementan la síntesis de IL-2 y la proliferación de LT estimulados con anti-CD3 o mitógenos, pero el uso de Abs anti-CD28, por sí mismos, son incapaces de originar la proliferación de LT y no tienen efecto en la producción de las citocinas ^{11,12}.

La transducción de señales generadas a través de CD28 no son muy claras pero se piensa que en la expresión del gen de IL-2, las señales generadas por el complejo TCR-CD3 y las generadas por CD28, convergen en el núcleo con la formación del complejo NF-AT-AP-1, necesario para la transcripción de IL-2. De esta manera la transducción de señales vía TCR-CD3 dirigiría que NF-AT sea translocado al núcleo, mientras que la transducción de señales vía CD28 podría contribuir a la formación de AP-1 a través de la fosforilación de jun ¹² (**Figura 2**).

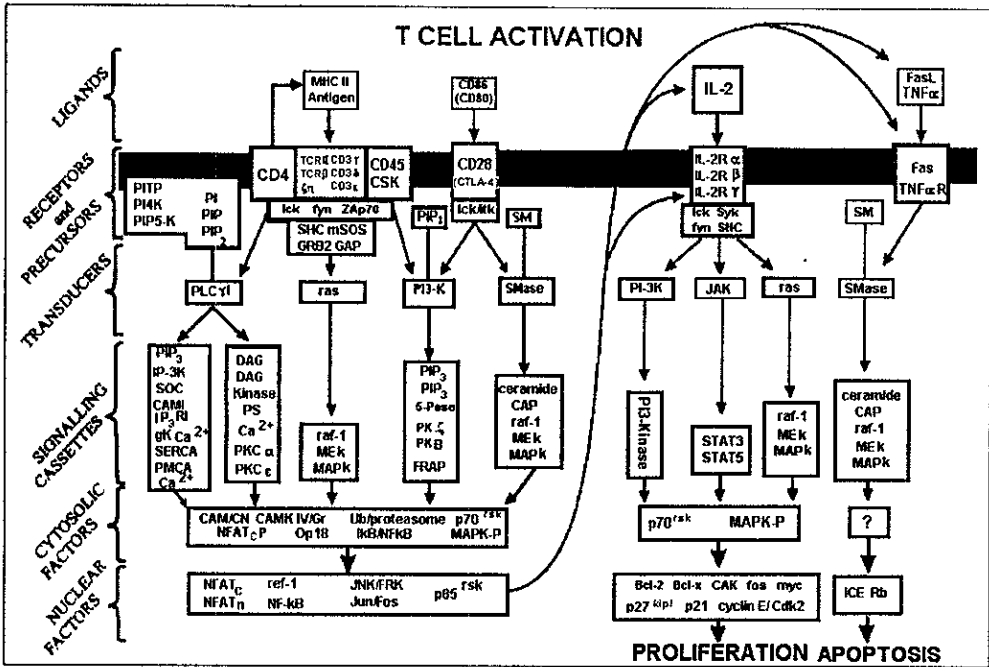


FIGURA 2.- Mapa de la transducción intracelular de señales cuando los LT son activados. La secuencia comienza con la interacción del antígeno unido al MHCII con el TCR y culmina varias horas después en proliferación ó apoptosis. Durante ésta secuencia, la información es transmitida de un componente de transducción de señales a una vía próxima que cuenta con receptores, precursores, transductores, cassettes de transducción de señales y efectores citoplásmicos y nucleares (tomado de Berridge M. ¹).

2.4.- ACTIVACIÓN NO FISIOLÓGICA

La activación no fisiológica del LT es mediada por un grupo de mAbs que reconocen la superficie del TCR. Estos incluyen los mAbs anti-TCR y anti-CD3. Como se mencionó anteriormente, CD3 tiene un papel muy importante en la transducción de señales, por tal motivo los mAbs anti-CD3 son los mas utilizados.

Otros anticuerpos contra antígenos de superficie de LT, como anti-CD2, también pueden activar a LT.

Entre los estímulos no fisiológicos para la activación de LT se incluyen diversas lectinas vegetales (fitohemaglutinina, PHA; concanavalina A, ConA), ionóforos de calcio (ionomicina), ésteres de forbol (forbol miristato-acetato, PMA), y agentes oxidantes, entre otros. Los ésteres de forbol tienen una parte estructural similar al DAG pero éstos son más estables a la degradación enzimática, por lo que mimetizan la activación de las PKCs durante mayor tiempo(**Figura 3**). Los ionóforos de calcio incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular, al igual que el IP_3 , y activan la calcineurina. Los anticuerpos anti-CD28 coestimulan la activación del LT ⁵.

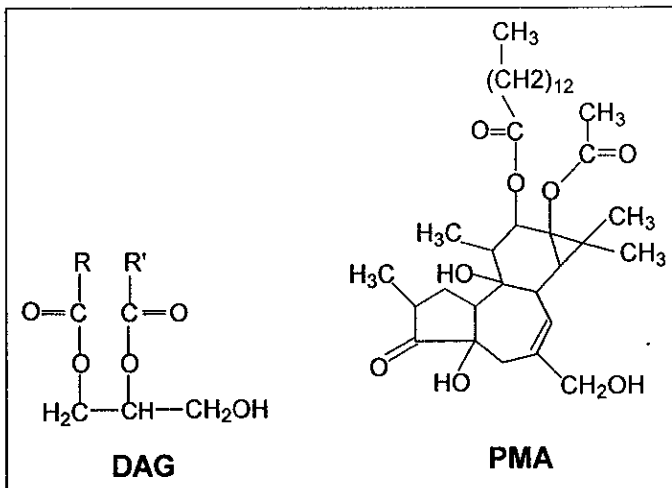


FIGURA 3. Estructuras del diacil glicerol (DAG) y el 4-forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). El PMA es utilizado para mimetizar los estímulos generados por el DAG debido a su homología y estabilidad

2.5.- ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B.

Al igual que su contraparte en los LT, el receptor de los LB (BCR) tiene múltiples componentes, que consisten básicamente de la inmunoglobulina de superficie (slg) asociada no covalentemente con un heterodímero de $Ig\alpha$ (CD79a) e $Ig\beta$ (CD79b)^{2,3}. El BCR contiene, en su dominio intracelular, residuos abundantes en tirosina, los cuáles son fosforilados por las PTK's src y Syk y permiten la asociación de otros componentes. La secuencia exacta de eventos no está completamente dilucidada, pero se ha descrito transducción de señales semejante a la que sucede en LT vía el TCR. Así, diversos transductores de señales, tales como SHC, PLC γ y PI 3-K, han sido encontrados en los LB^{1,13}. El procesamiento de la información a través del BCR puede ser modulado por una variedad de receptores transmembranales que no únen antígenos, mediante el ajuste de la sensibilidad del BCR dependiendo de la naturaleza y el sitio de acción del antígeno. El receptor complejo CD19/CD21 permite al LB determinar la intensidad de la respuesta inmune hacia al antígeno en camino. Así, si el antígeno está unido covalentemente con moléculas C3, no sólo se unirá a slg, sino que también se unirá al complejo CD19/CD21. Por lo que después de la internalización del Ag, la región citoplásmica de CD19 comienza ser fosforilada dirigiendo la formación de elementos de transducción tales como PI 3-K y Vav, de ésta manera la respuesta del sistema de reconocimiento es aumentada enormemente^{13,14}. Se ha demostrado que CD22, una molécula accesoria de adhesión que reconoce glucoproteínas, puede modular la transducción de señales a través del BCR. Por lo que después de la activación del BCR, CD22 comienza a ser fosforilado en sus residuos en tirosina, lo cual activa una PTP

(SHP) y así el complejo CD22/SHP actúa como un regulador negativo de la transducción de señales ^{14,15}.

Un sistema similar de regulación negativa del complejo BCR es mediado por FC γ RIIb1, un receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de IgG. FC γ RIIb1 también conlleva a la fosforilación de tirosinas y a la asociación de SHP ^{15,16}.

El reconocimiento específico de antígenos extraños por sIg induce la proliferación de LB y su diferenciación a células plasmáticas, las cuales producen Ig's solubles contra el Ag, o a células de memoria, que pueden responder rápidamente a encuentros subsecuentes con el mismo antígeno. Este proceso, sin embargo, requiere de la ayuda de LT activados. La activación antígeno específica de LT es dependiente de las interacciones con CPAs especializadas, tales como LB. Una vez activos, los LT promueven la activación de LB tanto por la acción de las citocinas, p.ej. IL-2, 4, 6 y 5, como por contacto directo intracelular a través de ligandos y receptores ^{2,3}.

2.6.- EL RECEPTOR DE IL-2

La IL-2 es una citocina derivada de LT y participa en la regulación del crecimiento y la diferenciación de una variedad de células que expresan el receptor de IL-2 (IL-2R), tales como LT, LB y macrófagos.

El IL-2R inicialmente es de intermedia afinidad y consiste de las cadenas β y γ , permitiendo a LT responder sólo a altas concentraciones de IL-2. Después de la liberación de IL-2, ésta se une al receptor de intermedia afinidad desencadenando un conjunto de señales intracelulares que permiten la expresión de la cadena α del RIL-2. La cadena α por si misma es de baja afinidad pero cuando se asocia a las cadenas β y γ forman al IL-2R de alta afinidad, el cuál permite a LT responder a bajas concentraciones de IL-2 ^{2,17}. La transcripción máxima y sostenida del gen de IL-2R α es modulada por la misma IL-2 (principalmente), actuando como un regulador positivo de retroalimentación en la expresión del IL-2R (regulación autocrina), y por estímulos externos (paracrinos) como IL-1 y TNF ^{18,19}.

Después de la activación de LT, hay una congregación de serina/treonina cinasas y tirosina cinasas (p.ej., lck, fyn, Syk, JAK1 y JAK3) en las cadenas intracelulares que conforman al RIL-2. Así, JAK1 y JAK3 son recluidas al complejo IL-2R donde fosforilan diversos sitios de las cadenas β y γ que entonces únen transductores de señales y activadores de transcripción (STATs). Los JAKs fosforilan los STATs, los cuáles viajan al núcleo para activar la transcripción. Se han identificado algunos otros eventos en ésta transducción de señales, como p. ej., Syk activa myc mientras que lck a fos a través de la vía de ras; Bcl-2, el cuál es crítico para la supervivencia y proliferación celular, parece ser regulado a través de PI 3-K. Además de la estimulación de los genes fos, myc y Bcl-2, la vía de IL-2 se intersecta con las proteínas del ciclo celular responsables de la iniciación de la proliferación celular.

La entrada a la fase S del ciclo celular es regulada por las ciclinas G1 (ciclina D y E) y sus cinasas asociadas dependientes de ciclinas (Cdk). Los complejos ciclina E/Cdk2 se mantienen secuestrados por proteínas inhibitorias tales como p21 y p27^{Kip}. En LT, un importante papel del sistema de transducción de señales de la IL-2 es remover la proteína inhibitoria p27^{Kip}, activando de esta manera Cdk2 y dirigir la entrada a la fase S del ciclo celular ^{18,20}.

2.7.- LA INTERACCIÓN CD40-CD40L

CD40 es una glucoproteína transmembranal tipo I que pesa aproximadamente 50 kDa y es expresada en células con alta potencia proliferativa, tales como progenitores hematopoyéticos, LB y células epiteliales, así como en CPAs, como células dendríticas, monocitos activados, LB y células dendríticas foliculares. El CD40L es una glucoproteína de membrana tipo II de 39 kDa, que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). CD40L es preferentemente expresado en LT CD4⁺ activados via su TCR, y en niveles variables, también es expresado en algunos monocitos, células NK, mastocitos, basófilos, LB y LT CD8.

La interacción CD40-CD40L juega un papel central en la respuesta inmune y es crucial para la respuesta de LB hacia Ag ^{21,22}.

Estudios *in vivo* han demostrado que la interferencia en ésta interacción, bien sea por manipulación en los genes o por la administración de mAbs contra éstas moléculas, inhiben tanto la respuesta inmune primaria y secundaria a Ags dependientes de LT, previenen la formación de centros germinales y la generación de células B de memoria. En humanos, las mutaciones en el gen que codifica para el CD40L resultan en el síndrome de hiper-IgM. Dicha inmunodeficiencia es caracterizada por la incapacidad de producir Acs de los isotipos IgG e IgA contra los Ags extraños. Muchos estudios *in vitro* han demostrado que la estimulación de LB vía CD40 induce su activación, resultando en proliferación y secreción de Igs, así como también induce cambio de isotipo de Igs (switch) en presencia de las citocinas apropiadas y dirige la generación de células B de memoria ^{23,24}. Así para el cambio de isotipo IgM a IgG4 e IgGE se requiere la presencia de IL-4, la cual es liberada por LT activados.

Cuando la interacción CD40-CD40L es bloqueada *in vitro* con CD40 soluble o con mAbs anti-CD40L, los LB no pueden proliferar o producir Igs en respuesta a las señales proporcionadas por LT, indicando que la interacción es requerida para la transducción de señales ²³. La estimulación con CD40L no sólo se presenta en LB sino en los diversos tipos celulares expresando el CD40; por ejemplo, en monocitos la interacción con CD40L resulta en la inducción de la expresión de citocinas y actividad tumurocida, en macrófagos amplifica la actividad microbicida.

No existen reportes acerca de la transducción de señales generadas a través de CD40L o si éstas existen, en contraste a las generadas a través de CD40. La

transducción de señales vía CD40 resulta en la activación de factores de transcripción, p.ej. NF- κ B, y es diferente de la generada por el BCR ²¹. Estudios recientes han mostrado que CD40 puede proveer una señal coestimuladora a LT.

Así en el diálogo que se mantiene entre CD40-CD40L , se induce un aumento en la expresión de CD80/CD86 en LB que a su vez coestimulan LT vía CD28/CTLA4, los cuales, mediante un ciclo de regulación positiva, aumentan su expresión de CD40L ^{21,28}.

2.8.- GLUCOCORTICOIDES E INMUNOSUPRESIÓN.

Los esteroides adrenales tienen una estructura básica de 17 carbonos que constituyen al núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno. El esqueleto de los glucocorticoides contiene 4 carbonos adicionales a ésta estructura: dos grupos metilos se encuentran en las posiciones C-18 y C-19, y en C-17 se encuentra una cadena que contiene los dos carbonos restantes (Figura 4). Para la actividad de los glucocorticoides se requiere un grupo hidroxilo en la posición C-11.

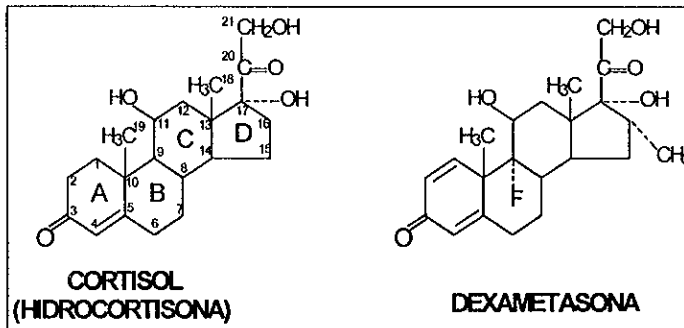


FIGURA 4. Estructura del esqueleto de los glucocorticoides y del glucocorticoide sintético dexametasona.

Los glucocorticoides son los agentes farmacológicos anti-inflamatorios e inmunosupresores más potentes. Son preferentemente administrados en procesos inflamatorios que en inmunosupresores. La Dexametasona es uno de los glucocorticoides sintéticos más ampliamente prescritos y es utilizada clínicamente tanto para inmunosupresión sistémica como local, y es 25 veces más potente que la hidrocortisona. Los glucocorticoides, en general, inhiben la síntesis de citocinas y moléculas de superficie requeridas para funciones inmunes ^{4,28}.

La activación transcripcional de genes de citocinas y moléculas de adhesión es crítica en la activación de respuestas inmunes e inflamatorias y son reprimidas por glucocorticoides. Sin embargo no se han encontrado elementos represivos de glucocorticoides en los promotores de citocinas. El mecanismo de acción por el cual los glucocorticoides generan la inmunosupresión, en general, no es del todo conocido, aunque se sabe que suprimen la secreción de IL-2.

El promotor de IL-2 contiene elementos en cis requeridos para una máxima inducción durante la activación de LT y los cuáles son reconocidos por Oct-1 (2), NF-AT-AP-1 (4), NF-AT (1) y NF- κ B(1) (Figura 5). NF- κ B se encuentra presente constitutivamente pero es secuestrado en el citoplasma por la asociación con una molécula inhibidora llamada I κ B. PKC media la fosforilación del I κ B resultando en su disociación del NF- κ B permitiendo así la migración del factor de transcripción al núcleo, uniéndose al promotor de IL-2 y aumentando la transcripción del gen³. Después de la unión de los glucocorticoides con su receptor citoplásmico, el complejo ligando-receptor es traslocado al núcleo como factor de transcripción y modula la expresión de genes específicos que codifican proteínas implicadas en la acción de los glucocorticoides. Se ha demostrado que el mecanismo por el cual los glucocorticoides inhiben la síntesis de IL-2 es por la inducción de la transcripción del gen que codifica para I κ B. Así el NF- κ B recién liberado se reasocia con el nuevo I κ B formado, reduciendo la posibilidad que el NF- κ B se transloque al núcleo^{29,30}. Esta disminución en el NF- κ B nuclear inhibe marcadamente la secreción de citocinas. A nivel celular, los glucocorticoides inhiben el acceso de los leucocitos a sitios de inflamación, interfieren con funciones leucocitarias, células endoteliales y fibroblastos. Además en LB pueden inhibir la producción de Ig's *in vivo* y el mecanismo de acción no es completamente claro³¹. Todos estos eventos descritos anteriormente, bloquean eficazmente la activación del sistema inmune dando lugar a la inmunosupresión.

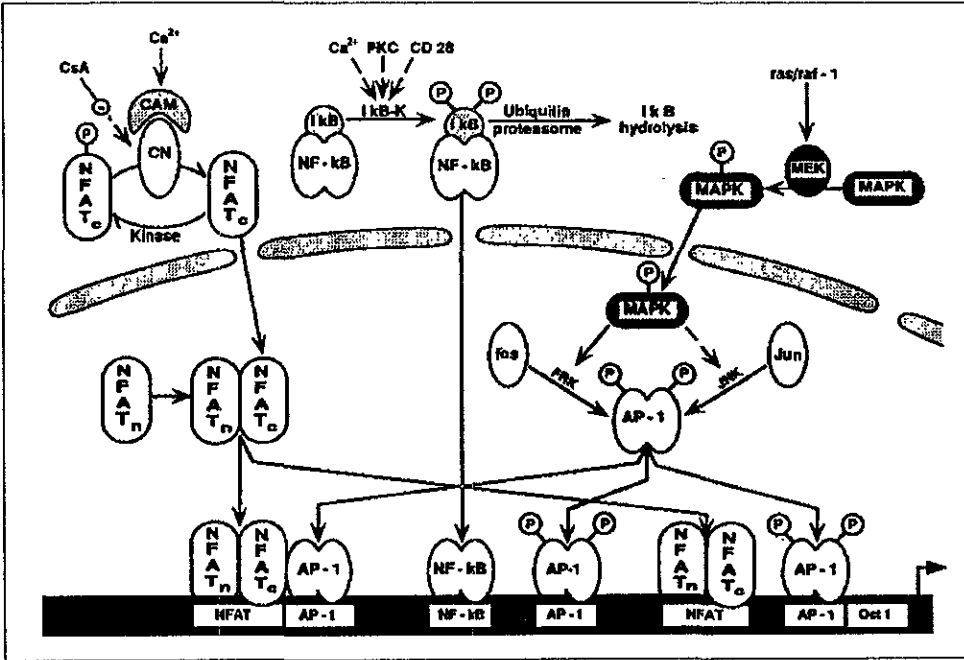


FIGURA 5.- Control de la transcripción del gen de IL-2. Algunos de los factores de transcripción tales como el NFAT y el NF κ B son activados en el citoplasma antes de entrar al núcleo. Otros, tales como AP-1, que consta de las proteínas fos y Jun, son activados dentro del núcleo por cinasas activas provenientes del citoplasma (tomado de Berridge M.)

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha determinado que mutaciones causadas en el gen que codifica para el CD40L genera, en modelos *in vivo*, el síndrome de hiper IgM caracterizado por un aumento en la secreción de anticuerpos predominantemente del isotipo IgM y la ausencia de los isotipos IgG e IgA. Por otra parte, dentro de los efectos de los glucocorticoides en estudios *in vitro*, se ha demostrado que inhiben la secreción de IL-2, la expresión de su receptor en líneas celulares de T y disminuyen la producción de IgM. Además, después de la administración de glucocorticoides a pacientes con lupus eritematoso sistémico, se presenta una mejoría en la agresividad de la enfermedad (menor daño tisular) y una disminución de las concentraciones séricas de Igs³¹. Dentro de los pocos estudios *in vitro* que demuestran la inhibición de la producción de Igs con glucocorticoides, no se ha demostrado que estos últimos inhiban el cambio de isotipo ni que afecten la interacción CD40-CD40L.

Dada la importancia del ligando de CD40 y la cadena α del receptor de IL-2 en la activación y proliferación tanto del linfocito T como del linfocito B, el papel de la interacción CD40-CD40L en el cambio de isotipo de las Igs y tomando en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, es de gran interés determinar si los glucocorticoides disminuyen el cambio de isotipo *in vitro*, como es afectan la expresión del CD40L y como modifican la interacción con CD40.

4. HIPÓTESIS

- Los glucocorticoides disminuyen la producción de Inmunoglobulinas *in vitro*.
- Los glucocorticoides disminuyen la expresión del ligando de CD40.
- Los glucocorticoides inhiben el cambio de isotipo a través de la interacción CD40-CD40L por una disminución de la expresión del CD40L.

OBJETIVOS

Determinar *in vitro* el efecto de los glucocorticoides en la producción de Inmunoglobulinas (IgM e IgG).

Determinar el efecto de los glucocorticoides en la expresión del ligando de CD40 y la cadena α del receptor de IL-2 en un linfoma T y en Linfocitos T de sangre periférica.

Determinar el efecto de los glucocorticoides en el cambio de isotipo a través de la interacción CD40-CD40L

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para abordar y responder las objetivos planteados, la presente tesis se dividió en tres partes.

En la primera parte se determina si los glucocorticoides causan disminución en la secreción de Igs *in vitro*, utilizando un sistema de cocultivo de linfocitos T con linfocitos B. Inicialmente se prueba el sistema experimental a utilizar con un efecto ya conocido de los glucocorticoides sobre los LT: inhibición de la secreción de IL-2. En ambos sistemas, los linfocitos T son activados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 con la finalidad de mimetizar la estimulación y la coestimulación *in vitro*.

En la segunda parte se determina si la disminución de la secreción de Igs está dada por la inhibición de la expresión del CD40L con glucocorticoides. En esta parte se toma a la par la cadena α del receptor de IL-2, otro marcador de activación de LT cuya expresión se ha demostrado ser disminuída con glucocorticoides. El efecto de los glucocorticoides en la expresión del CD40L y el IL-2R α , se realiza tanto en un linfoma T (células Jurkat) como en LT de sangre periférica de individuos sanos.

En la tercera parte se busca el efecto de los glucocorticoides en la interacción CD40-CD40L en cocultivos LT-LB utilizando un agente bloqueador de dicha interacción. Finalmente se observa el efecto de los glucocorticoides a nivel de LB y se utiliza un agente bloqueador de la activación de LB vía CD40.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Reactivos y soluciones generales. La Dexametasona (Alin^{MR}) fué obtenida de Chinoín, Laboratorios Farmacéuticos. Amortiguador de sales de fosfatos (PBS): NaCl 15 mM, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.4 utilizando agua bidestilada y filtrándolo por una membrana de 0.22 µm cuando se requiera. Buffer de lisis: NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂EDTA 0.1 mM pH 7.4. Medio de cultivo: RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Iansa) descomplementado (30 min a 56°C) al 10%, glutamina (Gibco BRL) 0.05 mM, aminoácidos no esenciales (Gibco BRL) al 1%, piruvato de sodio (Sigma) al 1%, 2-mercaptoetanol (Sigma) y antibióticos (gentamicina y ciproxina). La solución de bromuro de 2-aminoetilisotiuronium (AET, Sigma) fué preparada justo antes del momento de utilizarse así como la solución sustrato para el ensayo de ELISA.

Células y cultivos. La líneas celulares Jurkat (linfoma T) y CTLL-2, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Jurkat ha sido un modelo experimental ampliamente utilizado para estudios *in vitro*³² por la facilidad de cultivo y homología a LT. Los linfocitos T y B fueron obtenidos de voluntarios sanos. Todos los cultivos y cocultivos se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% utilizando medio RPMI suplementado.

Aislamiento de Linfocitos T y B por formación de rosetas³³: Linfocitos T y B fueron obtenidos de sangre periférica por venopunción utilizando jeringas con heparina y siempre en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (Forma Scientific, USA). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron obtenidas por gradiente de centrifugación (2000 rpm por 30' a temperatura ambiente) de la sangre heparinizada mezclada con PBS en una relación 1:1 y colocada sobre Ficoll-Hypaque (Sigma). Las PBMC fueron lavadas tres veces con exceso de PBS y fueron incubadas a una concentración final de 5×10^6 PBMC/mL en presencia de metil-éster de leucina (L-OMe, Sigma) (5 mM) en RPMI suplementado libre de SFB, durante 40' a temperatura ambiente. De esta manera las células fagocíticas (como macrófagos) y citotóxicas (como células NK), pero no LT o LB, fueron eliminadas por la incorporación del L-OMe y su conversión en L-leucil-L-leucina por enzimas lisosomales, el cuál es muy tóxico y letal para las células vacuoladas. Eritrocitos de carnero (SRCB) fueron incubados durante 20' a 37°C en presencia de AET (0.14 M, Sigma) para inducir la expresión del receptor de CD2, después fueron lavados por tres veces con PBS y colocados en RPMI a una concentración final del 4%. 1×10^7 PBMC/mL fueron colocadas con 4 mL de SRBC/AET en RPMI suplementado + 2 mL de SFB y centrifugadas a 800 rpm por 5' a 4°C y posteriormente incubadas en hielo hasta la formación de rosetas (comprobada por microscopía óptica). La mezcla de PBMC/SRBC/SFB fué cuidadosamente resuspendida y sometida a un gradiente de centrifugación (2000 rpm por 35' a 4°C) sobre Ficoll-Hypaque del cual se aislaron las rosetas (en el fondo) y LB (interfase), los cuales son células no formadoras de rosetas por no expresar CD2. De las rosetas aisladas se libera los LT de los SRBC mediante

tratamiento con buffer de lisis. Estos fueron lavados por tres veces con PBS y resuspendidos en RPMI listos para utilizarse. Los LB fueron sometidos a un segundo roseteo de la misma manera y aislados por gradiente de centrifugación. La pureza de LT y LB fué determinada por citometría de flujo utilizando Acs anti-CD2 y anti-CD19 respectivamente.

Anticuerpos y activadores. Los hibridomas que secretan Acs anti-CD3 (OKT3) y anti-CD40 (G28-5) fueron obtenidos de la ATCC. Los Acs fueron purificados de los sobrenadantes de cultivo de dichos hibridomas por cromatografía de afinidad, utilizando columnas de sepharosa-proteína A (anti-CD3) y sepharosa-proteína G (anti-CD40) y ambos fueron dializados en PBS. Anti-CD28 (mAc 9.3) y Anti-CD3 (64.1) contenidos en ascitis, fueron donados generosamente por Jeff Ledbetter. Los Acs anti-CD40L (clona 24-31) humano purificados, fueron donados por Randy Noelle (Dartmouth Medical College, NH) y posteriormente fueron biotinilados. La estreptavidina-FITC (isotiocianato de fluoresceína) y anti-ratón-FITC fueron obtenidos de Boehringer Mannheim y los Acs conjugados a FITC anti-CD25 (RIL-2 α), anti-CD2 y anti-CD19 de Dako. Para los estudios de citometría de flujo, todos los Acs fueron utilizados en concentraciones óptimas saturantes. Los Acs para ELISA fueron los siguientes: anti-IgG Humana y anti-IgM Humana ambos anti-fragmentos Fc (Sigma), anti-IgG Humana y anti-IgM Humana ambos conjugados a peroxidasa (Jackson) y todos desarrollados en cabra. El éster de forbol utilizado fué el 4-forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma) y el ionóforo de calcio, Ionomicina (Boehringer Mannheim).

Activación de células Jurkat y LT. las células Jurkat fueron cultivadas en cajas de cultivo con medio RPMI hasta una densidad aproximada de 5×10^5 células/mL y fueron lavadas 2 veces con PBS antes de ser activadas. En placas de 24 pozos (Costar) y en condiciones de esterilidad, fueron sensibilizados anti-CD3 (900ng/pozo) y/o anti-CD28 (1:1000 de ascitis) en Tris-base 50 mM pH 9 durante 1.5 h a 37°C, en los cuáles fueron colocadas 1×10^6 células/mL (viabilidad determinada por exclusión con azul tripano), y en pozos no sensibilizados fueron colocadas 1×10^6 Jurkat/mL en presencia de ionomicina (1 µg/mL) y/o PMA (10 ng/mL). 5×10^5 LT fueron colocados en placas de 96 pozos (Costar) sensibilizados con anti-CD3 (1:1000 de ascitis 64.1) y/o anti-CD28 (1:1000 de ascitis) en Tris-base 50 mM pH 9 durante 1.5 h a 37°C y en pozos no sensibilizados se colocaron 5×10^5 LT y activados con Ionomicina/PMA a la misma concentración que en Jurkat. Todas las activaciones se realizaron en presencia o ausencia de Dexametasona (10^{-7} M) durante 6 h o 24 h. Como control se utilizaron las mismas células en iguales condiciones experimentales, pero sin la presencia de activadores, con la finalidad de excluir la posibilidad que se activen por sí mismas y observar su expresión basal (tiempo 0).

Tinción de células y citometría de flujo. Inmediatamente después del tiempo de activación celular, se detuvo la actividad metabólica celular durante todo el procedimiento de tinción mediante la adición de azida de sodio (NaN_3) y trabajando a temperaturas bajas (4°C) o en hielo. Las muestras fueron lavadas (resuspendiendo y centrifugando a 2000 rpm por 2') por tres veces con PBS-SFB(2%)- NaN_3 (0.2%),

posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo dirigido contra la molécula en estudio durante 30'. Para buscar la presencia del RIL-2 α y CD2 se realizaron tinciones directas. Después se realizaron tres lavados con PBS-SFB-NaN₃ y se incubó con un segundo Ab: estreptavidina-FITC y anti-raton-FITC para el CD40L y CD19 o CD40, respectivamente. Se realizaron tres lavados con PBS-SFB-NaN₃ y las células fueron resuspendidas en PBS-SFB-NaN₃ en presencia de ioduro de propidio(10 μ g/mL, Sigma). El ioduro de propidio fué utilizado con la finalidad de observar viabilidad celular, ya que éste se incorpora en células muertas haciéndolas adquirir fluorescencia roja. La citometría de flujo³³ es una técnica en la cual una suspensión celular es sometida a una corriente con un líquido de arrastre (PBS) a presión constante, de tal manera que un haz láser detecta células individuales y determina la intensidad de fluorescencia emitida por algún fluorocromo (p. ej. FITC o Ioduro de propidio), presente en cada célula, a una longitud de onda dada. Se utilizó un citómetro de flujo (FACScan Becton Dickinson) y el programa Lysis II en la adquisición y análisis estadístico.

Ensayo de proliferación por reducción de las sales de MTT. Para estos ensayos se utilizó una línea celular (CTLL-2) que es estrictamente dependiente de la presencia de IL-2 en el medio para su sobrevivencia. De esta manera, células CTLL-2 en presencia de IL-2 reducen las sales de MTT provocando la ruptura del anillo de la sal de tetrazolium MTT (Bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol-2 il)-2,5 difeniltetrazolium) dando lugar a la formación de un producto colorido llamado formazán medible en un lector de ELISA a 570nm. Las células CTLL-2 fueron cultivadas en presencia de IL-2 hasta un crecimiento exponencial y fueron lavadas tres veces con un exceso de RPMI no

suplementado e incubadas por 15' a temperatura ambiente con la finalidad de agotar toda la IL-2 presente. Posteriormente, fueron sembradas 2.5×10^4 células en 50 μL de medio RPMI suplementado en placas de 96 pozos y se les agregó 20 μL de los sobrenadantes de los ensayos de activación + 30 μL de medio RPMI suplementado para buscar la presencia o ausencia de IL-2. Se incubó durante 24h y se les adicionó 20 μL de MTT (5 mM) dejando 5 h en incubación para la formación de cristales de formazán. Los cristales fueron disueltos colocando 100 μL de HCl (0.1N) en SDS (Sigma) al 10% en cada pozo y dejando incubar durante toda la noche. El control de células consistió en colocar las células CTLL-2 en ausencia de IL-2 con los demás reactivos. Las lecturas fueron tomadas en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan Multisoft) a 570 nm tomando como blanco un control de reactivos. Los valores se analizaron como índice de proliferación, el cuál está dado por la relación de la absorbancia de la muestra menos la del control de reactivos entre la del control de células y todos los pozos fueron realizados por duplicado.

Cocultivos LT-LB. Placas de 96 pozos con fondo en U (Costar) se sensibilizaron con Acs anti-CD3/CD28 (como para la activación de LT) en la cual se colocaron 1×10^3 LT y 5×10^4 LB /pozo en presencia o ausencia de Dexametasona y en pozos no sensibilizados se colocaron LB o LB-LT como controles en las mismas condiciones. Para todos los cocultivos se utilizó medio RPMI y un volumen final de 200 μL en cada pozo. Cuando se quiso ver el efecto de un agente bloqueador de la interacción CD40-CD40L, se utilizaron Acs anti-CD40L soluble (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los cocultivos fueron

incubados durante 10 días en condiciones de cultivo y cada pozo fue montado por duplicado.

Activación de LB. Se sensibilizaron placas de 96 pozos con fondo en U con Acs anti-CD40 (1µg/pozo) en Tris-base 50 mM pH 9 durante 1.5 h a 37°C y posteriormente fueron colocadas 5×10^4 LB por pozo en presencia o ausencia de Dexametasona.

En pozos no sensibilizados se colocaron LB para descartar la posibilidad que LB se activen por sí mismos. La quimera CD40-Ig (10µg/mL) fué colocada para evaluar el efecto de un agente bloqueador en la activación de LB y se utilizó anti-lisozima de gallina como Ac irrelevante (IgG1). En todos los pozos se utilizó medio RPMI y el volumen final fué de 200 µL. Las placas fueron cultivadas durante 10 días, en donde todos los pozos fueron montados por duplicado.

Determinación de IgG e IgM por ELISA. Al término de cultivo de los LB y cocultivos LT-LB, se recolectaron los sobrenadantes (SN) y se determinó el patrón de Inmunoglobulinas (Ig's) como sigue: Para IgG se realizó una dilución 1:4 de los SN en PBS-Tween (1%) y para IgM una dilución 1:2. Anti-IgG (10 µg/mL) o anti-IgM (10 µg/mL) se sensibilizaron en placas de 96 pozos para ELISA (Nunc MaxiSorp) en buffer de carbonatos pH 9.5 durante 2 h a 37°C y se realizó dos lavados con PBS. Se bloqueó con leche (Sveltis) al 3 % en buffer de carbonatos, durante 2 h a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween (0.1%) y se incubaron 50 µL de los SN o diluciones de un suero control como puntos de una curva patrón durante 2 h a 37°C. Se realizaron 5

lavados exhaustivos con PBS-Tween y se incubó con 50 μ L de anti-IgG o anti-IgM conjugados a peroxidasa (dilución 1:10 000 para ambos) durante 30' a 37°C. Se efectuaron 5 lavados exhaustivos con PBS-Tween y se colocó como sustrato 50 μ L de una solución de OPD (1 μ g/mL) y H₂O₂ como catalizador. Se incubó durante 10' a temperatura ambiente en ausencia de luz para desarrollar color luego del cual se paró la reacción con HCl 3N. Las placas fueron leídas en un lector de ELISA a 492 nm considerando blancos de reactivos. Todos los pozos para ELISA fueron efectuados por duplicado y La concentración de Ig's fué determinada de la regresión lineal de las curvas patrón realizadas en cada experimento ($r^2 \geq 0.9$.) y determinando el valor de la desviación estándar.

7.- RESULTADOS

7.1.- EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN EL CAMBIO DE ISOTIPO DE LAS INMUNOGLOBULINAS

7.1.1.- PUREZA DE LINFOCITOS T

Los Linfocitos T fueron aislados de sangre periférica de voluntarios sanos. La pureza utilizada para todos los experimentos siempre fué mayor o igual al 97%, como lo indica la **Figura 6**.

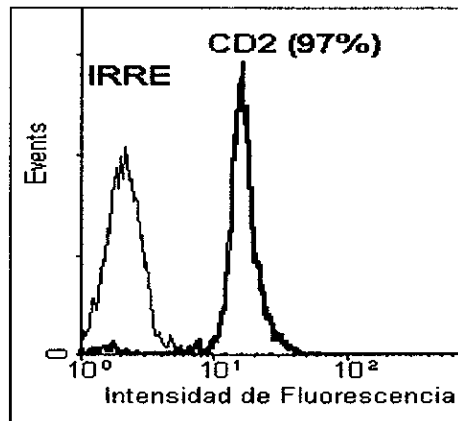


FIGURA 6. Pureza de los LT de sangre periférica de voluntarios sanos aislados por la formación de rosetas. Histograma de citometría de flujo que muestra la pureza de células CD2 positivas, medida a través del desplazamiento de la intensidad de fluorescencia de un anticuerpo anti-CD2-FITC, tomando como control un Ac irrelevante

7.1.2.- EFECTO DE LA DEXAMETASONA EN LA PRODUCCIÓN DE IL-2.

Con el fin de demostrar que el glucocorticoide (dexametasona) inhibe la producción de IL-2 en LT se realizó un ensayo de proliferación de células dependientes de IL-2 (células CTLL-2).

Tomando en cuenta que en la mayoría de los estudios *in vitro* los glucocorticoides han sido utilizados a una concentración final de 10^{-7} M, una concentración estimada en niveles tisulares ⁴, y partiendo del hecho que anticuerpos anti-CD28 aumentan la síntesis de IL-2 y la proliferación de LT cuando se estimulan con anti-CD3 ¹², los LT fueron activados con Acs anti-CD3 y anti-CD28 (anti-CD3/CD28) en presencia o ausencia de dexametasona (10^{-7} M) y los sobrenadantes (SN), después de 24 horas de activación, fueron probados en células CTLL-2 para buscar la presencia o la ausencia de IL-2 (**Figura 7**).

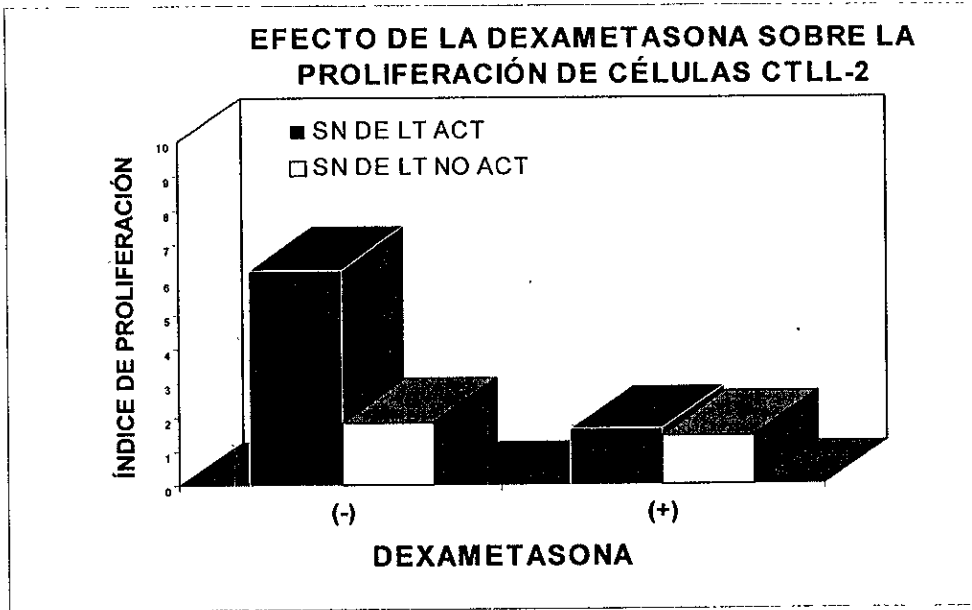


FIGURA 7. Inhibición de la producción de IL-2 en LT de sangre periférica con dexametasona. LT fueron estimulados con dosis óptimas, previamente determinadas, de anti-CD3/CD28 inmovilizados, en presencia ó ausencia de dexametasona (10^{-7} M) durante 24h. Los sobrenadantes fueron colocados con células CTLL-2 y se observó la proliferación por reducción de las sales de MTT. Índice de proliferación = (Absorbancia de la muestra - Absorbancia del control reactivos) / Absorbancia del control células (longitud de onda = 570 nm).

Como se observa, los LT de sangre periférica son capaces de producir IL-2 cuando son activados con anti-CD3/CD28 y la dexametasona inhibe la producción de IL-2 cuando está presente en los ensayos de activación.

Tomando este fenómeno como control positivo, indicando que tanto el sistema como el glucocorticoide tienen el efecto funcional, se estudió posteriormente el efecto de la dexametasona en la producción de las inmunoglobulinas.

7.1.3.- PUREZA DE LINFOCITOS B

Los linfocitos B fueron aislados de sangre periférica de voluntarios sanos mostrando una pureza siempre mayor al 97% de células CD19 positivas (**Figura 8**).

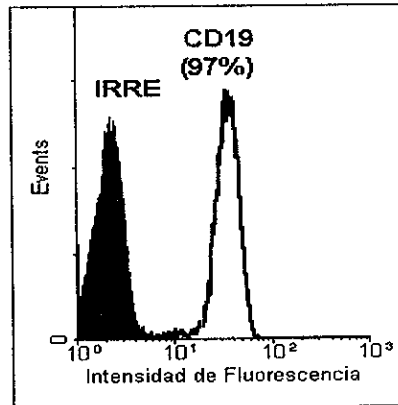


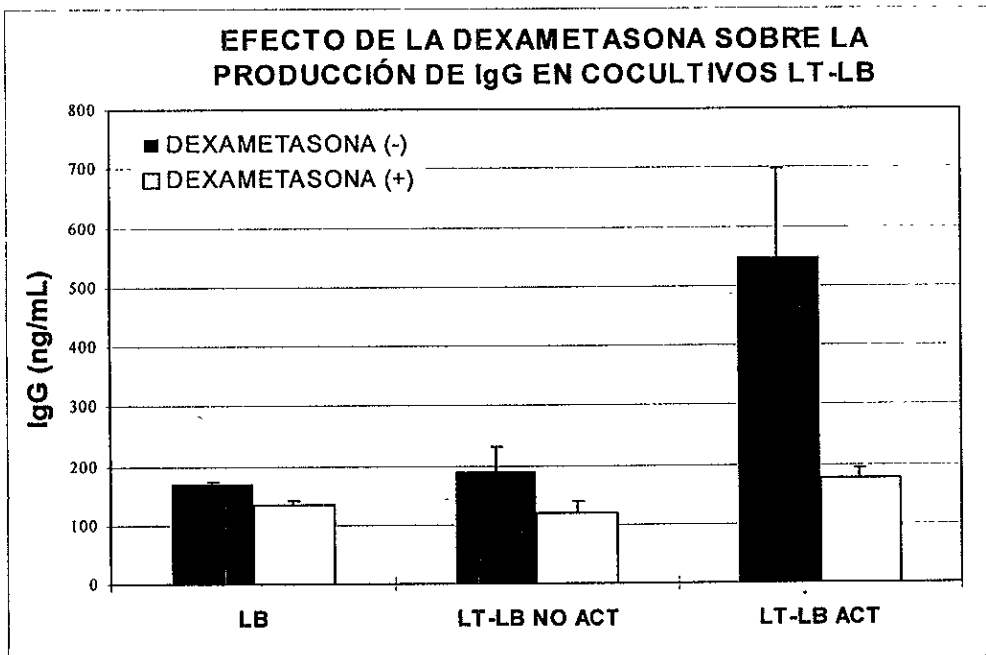
FIGURA 8. Pureza de Linfocitos B. Linfocitos B de sangre periférica aislados de voluntarios sanos por doble roseteo (células no formadoras de rosetas). Histograma de citometría de flujo que muestra la pureza de LT medida através del desplazamiento de un anticuerpo anti-CD19 tomando como control un Ac irrelevante

7.1.4.- EFECTO DE LA PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS CON DEXAMETASONA

Para determinar el efecto de la dexametasona en la producción de las inmunoglobulinas, los LT se activaron con Acs anti-CD3/CD28 y fueron cocultivados con LB en presencia o ausencia de dexametasona

En la **Figura 9** se muestra claramente que los LT requieren ser activados para ejercer su función efectora sobre LB en la liberación de Igs. Por lo tanto, cuando no se activan los LT, los LB liberan una cantidad de IgG ó IgM menor, y éstos en ausencia de LT, prácticamente no se activan por si mismos. El hecho de que se observe la secreción de IgG sólo cuando LB son activados tras la activación de LT, sugiere que se consiguió el cambio de isotipo. Se puede apreciar que la dexametasona disminuye la producción de Igs, cuando LT son activados, siendo mayor el efecto para la secreción de la IgG (33%) que para IgM (52%). De esta manera, la dexametasona disminuye la secreción de IgG prácticamente hasta concentraciones basales, comparables a las producidas por los LB en ausencia de LT.

A



B

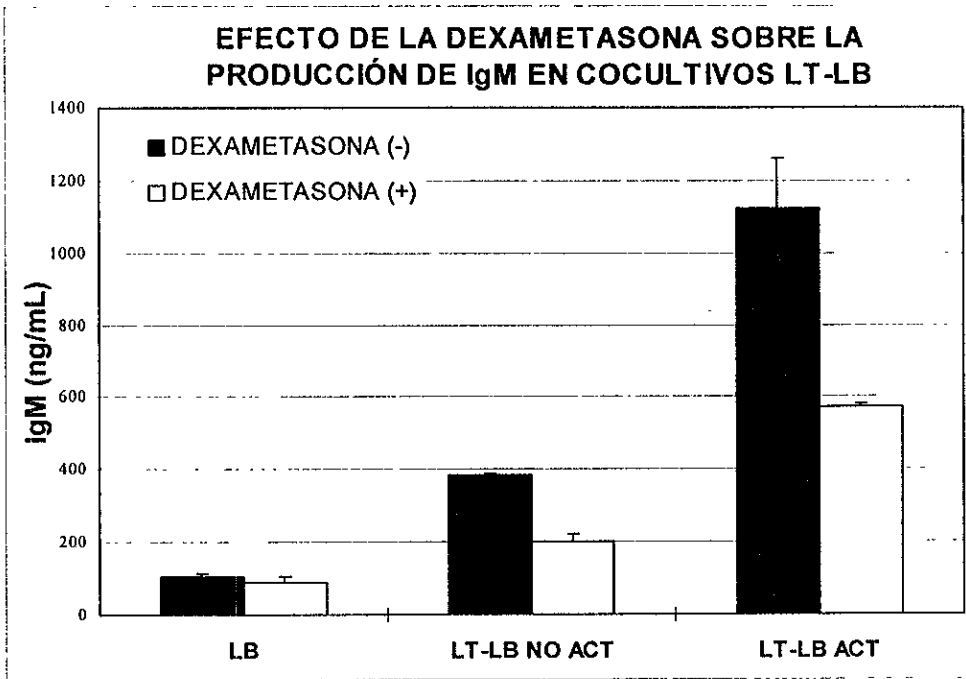


FIGURA 9. Disminución de la producción de IgG (A) e IgM (B) con dexametasona en cocultivos de LT-LB. LT fueron activados con dosis óptimas de anti-CD3/CD28 inmovilizados, se añadieron LB en una relación LT-LB 1:5 (ver material y métodos) y fueron cocultivos en presencia (□) ó ausencia (■) de dexametasona (10^{-7} M). Después de 10 días de cocultivo, los SN fueron recolectados y se determinó la concentración de IgG e IgM por ELISA isotipo específica. (resultados representativos de 3 experimentos independientes).

Con los experimentos anteriores se pudo mostrar que la dexametasona disminuye la producción de Igs, y que el efecto sobre la producción de IgG podría deberse a una inhibición en el cambio de isotipo.

7.2.- EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA EXPRESIÓN DEL CD40L Y EL RIL-2 α .

Dado que para el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas se requiere de la interacción CD40-CD40L, se decidió estudiar el efecto de la dexametasona en la expresión del CD40L por células Jurkat y LT de sangre periférica.

7.2.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS JURKAT.

Dada la facilidad de cultivo de las líneas celulares de Linfoma T, su rápido crecimiento, duplicación y versatilidad, inicialmente se utilizaron células Jurkat como modelo experimental para este sistema en estudio. Inicialmente se determinó la expresión de CD3 y CD28 en la superficie celular de Jurkat (**Figura 10**).

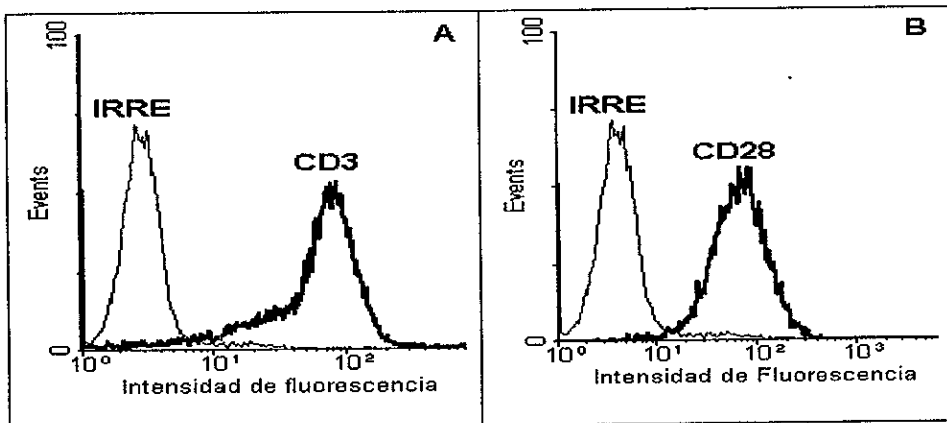


Figura 10. Expresión constitutiva de CD3 (A) y CD28 (B) en células Jurkat. Histogramas de citometría de flujo mostrando los desplazamientos de la intensidad de fluorescencia de los Acs anti-CD3 y anti-CD28 (ambos revelados con anti-ratón-FITC), tomando como control un anticuerpo irrelevante.

7.2.2.- EFECTO DE LA DEXAMETASONA EN LA PRODUCCIÓN DE IL-2 EN CÉLULAS JURKAT.

Una vez que se observó la expresión de CD3 y CD28, las células Jurkat fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3/CD28 en presencia o ausencia de dexametasona durante 24 h y los sobrenadantes (SN) fueron probados en células CTLL-2 para buscar IL-2 (Figura11).

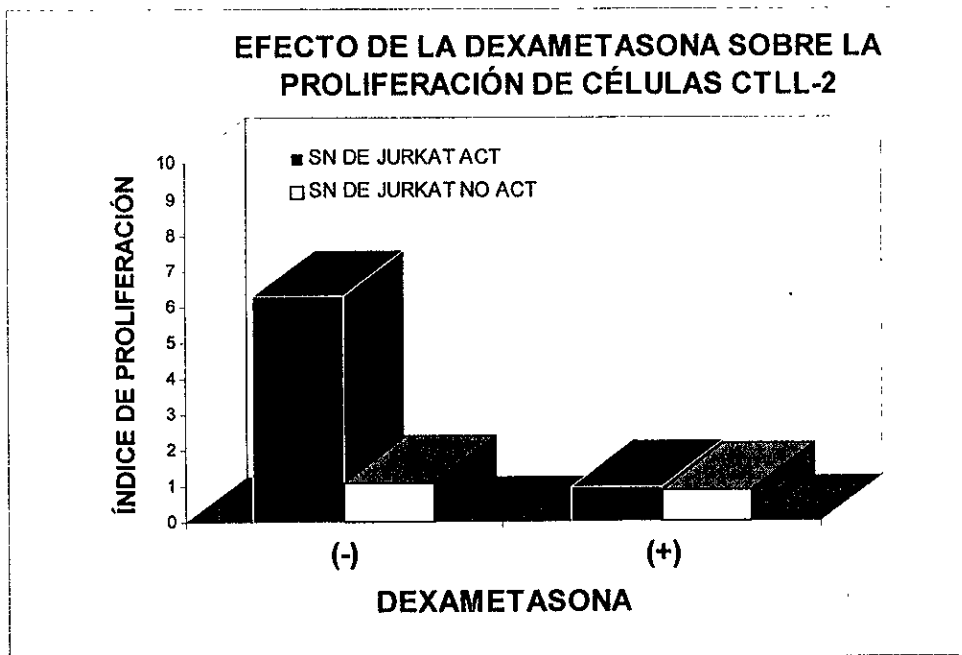


FIGURA 11. Inhibición de la secreción de IL-2 con dexametasona en células Jurkat. Jurkat fueron estimuladas con anti-CD3/CD28 inmobilizados (■) ó no estimuladas(□), en presencia ó ausencia de dexametasona (10^{-7} M) durante 24h. Los sobrenadantes fueron colocados con células CTLL-2 y se observó la proliferación por reducción de las sales de MTT. Índice de proliferación = (Absorbancia de la muestra - la del control de reactivos) / Absorbancia del control de células (Abs. a 570 nm).

Como puede apreciarse, al igual que en LT, las células Jurkat son capaces de producir IL-2 sólo cuando son activadas y la dexametasona inhibe esta secreción. Una vez demostrado este efecto ya conocido de los glucocorticoides, se estudió el efecto de la dexametasona en la expresión del CD40L y como control se determinó la expresión del RIL-2 α , un marcador de activación para LT y células Jurkat, ampliamente estudiado.

7.2.3.- CINÉTICA DE EXPRESIÓN DEL CD40L Y IL-2R α EN CÉLULAS JURKAT

Se ha reportado que RIL-2 α Y el CD40L son moléculas de superficie inducibles y que el CD40L es de expresión transitoria^{22,23}, por lo que el estudio preliminar que se realizó en células Jurkat, fué determinar la cinética de expresión de éstas dos moléculas. Así entonces, las células Jurkat fueron estimuladas con Acs anti-CD3 y/o anti-CD28 o Ionomicina/PMA durante los tiempos 6h y 24h y se buscó la expresión del RIL-2 α y CD40L por citometría de flujo, utilizando Acs contra dichas moléculas.

Como se podrá notar en la **Tabla 1**, CD40L muestra mejor expresión bajo el estímulo con anti-CD3 que con Ionomicina/PMA mientras que para el RIL-2 α se observa un efecto contrario, mejor expresión bajo el estímulo de Ionomicina/PMA que con anti-CD3.

También se podrá notar que tanto el CD40L y el RIL-2 α muestran un máximo de expresión a las 24h tras el estímulo de Ionomicina/PMA o anti-CD3 y el simple estímulo que ejerce la señal coestimuladora (anti-CD28) en ausencia de la señal primaria (anti-CD3), no es capaz de inducir la expresión de las moléculas en estudio, pero cuando se encuentran ambas (anti-CD3/CD28), observamos un efecto sinérgico en la inducción de la expresión de ambas moléculas.

CD40L				
Tiempo (h)*	Iono/PMA	anti-CD3	anti-CD28	antiCD3/CD28
6	4.4	4.09	3.00	4.81
24	5.79	7.55	2.82	13.41
IL-2R(α)				
6	3.28	3.35	2.94	3.81
24	5.09	4.51	2.6	10.46

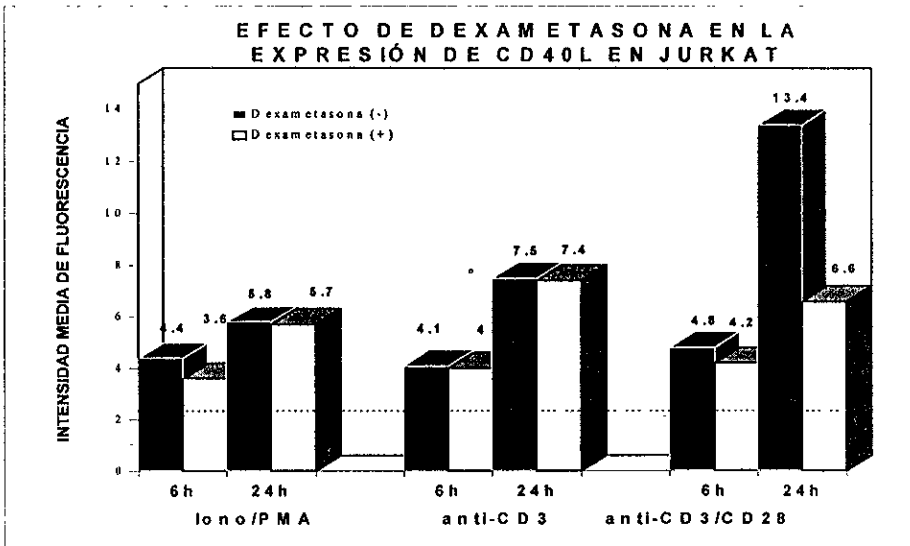
*T= 0 h: IL-2R(α) 2.4; CD40L: 2.8.

TABLA 1. Cinética de expresión del CD40L y el RIL-2(α) en células Jurkat con los diferentes estímulos utilizados. Los valores están dados como intensidad media de fluorescencia que los Acs contra dichas moléculas producen. Valores obtenidos por análisis de citometría de flujo. (Resultados de un experimento representativo de 4 independientes).

7.2.4.- EFECTO DE LA DEXAMETASONA EN LA EXPRESIÓN DEL CD40L Y EL RIL-2 α EN CÉLULAS JURKAT.

El efecto que la dexametasona ejerce sobre la expresión de dichas moléculas se examinó en ambos tiempos ya que existía la posibilidad de que ejerciera una acción mas temprana que en su máximo de expresión. En la **Figura 12** se observa que cuando las células Jurkat son activadas con Ionomicina/PMA o anti-CD3 no hay inhibición en la expresión del CD40L, en ambos tiempos de activación, pero cuando utilizamos el estímulo anti-CD3/CD28 la dexametasona muestra un efecto inhibitorio, siendo este mayor a las 24 horas de incubación. Para el RIL-2(α) se observa un fenómeno similar donde la expresión de dicha molécula no se inhibe cuando se activan las células Jurkat con Ionomicina/PMA o anti-CD3 y son tratadas simultáneamente con dexametasona, a las 6 y 24 h, pero cuando éstas se encuentran bajo el estímulo de anti-CD3/CD28 la dexametasona es capaz de inhibir la expresión del RIL-2(α) hasta las 24h. En todos los casos, la dexametasona ejerció un efecto inhibitorio apreciable hasta las 24h, el cuál es el tiempo de máxima de expresión de ambas moléculas, por lo que la dexametasona no tiene efectos tempranos.

A



B

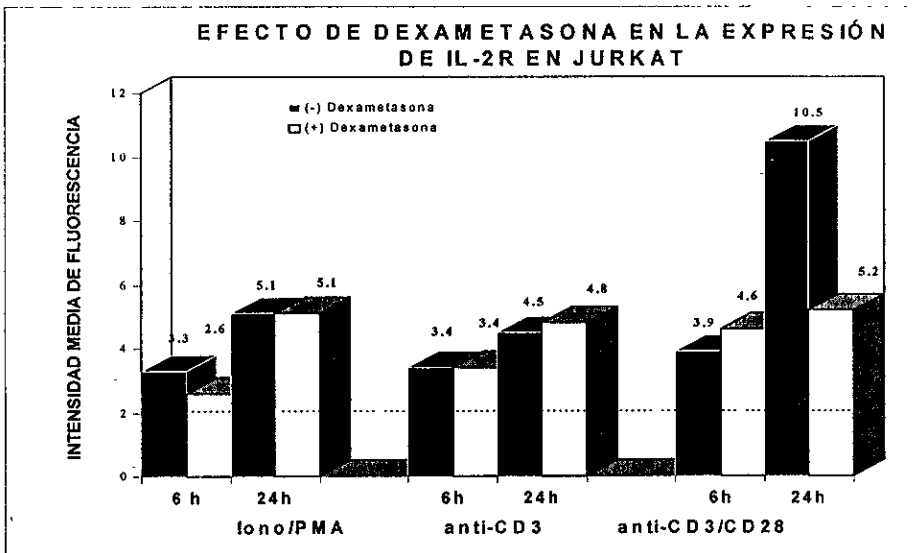


FIGURA 12. Efecto de la dexametasona en la expresión del CD40L (A) y el RIL-2 α (B) en células Jurkat. Células Jurkat fueron activadas con los diferentes estímulos que se muestran en presencia (□) ó ausencia (■) de dexametasona (10^{-7} M) a las 6 y 24 horas ($t=0$: línea punteada). Valores obtenidos de análisis de citometría de flujo (resultados representativos de 3 experimentos independientes)

El hecho de que se haya observado un fenómeno inverso en la expresión del RIL-2 α y el CD40L cuando activamos células Jurkat con Ionomicina/PMA o anti-CD3, sugiere la existencia de mecanismos moleculares independientes para la expresión de tales moléculas.

Tomando en cuenta lo anterior y considerando que las células Jurkat son una línea celular tumoral que presenta gran variabilidad genotípica³² y por lo tanto que los efectos que la dexametasona ejerce sobre éstos dos marcadores de activación podrían ser no del todo extrapolables en humanos sanos, así entonces, se estudió el efecto de los glucocorticoides en la expresión del RIL-2(α) y el CD40L en Linfocitos T de sangre periférica de pacientes sanos.

7.2.5.- CINÉTICA DE EXPRESIÓN DEL CD40L Y IL-2R α EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA.

Al igual que en células Jurkat, se estudió la cinética de expresión del CD40L y el RIL-2 α en LT de sangre periférica, a los tiempos 6 y 24 h, utilizando los mismos activadores que en Jurkat. La **Figura 13** muestra que la expresión del CD40L tiene un máximo de expresión a las 24 h, mejor expresión bajo el estímulo de Ionomicina/PMA que el de anti-CD3 y un efecto sinérgico cuando utilizamos anti-CD3/CD28.

El RIL-2 α es mejor inducible en LT que en células Jurkat mostrando un máximo de expresión a las 24h tanto para Ionomicina/PMA como para anti-CD3 y también se observa un efecto sinérgico cuando se utiliza anti-CD3/CD28.

En LT no se encontró la misma dicotomía que en células Jurkat de las vías para la expresión del RIL-2 α y el CD40L, ya que la expresión de ambas moléculas fué mejor con Ionomicina/PMA que con anti-CD3.

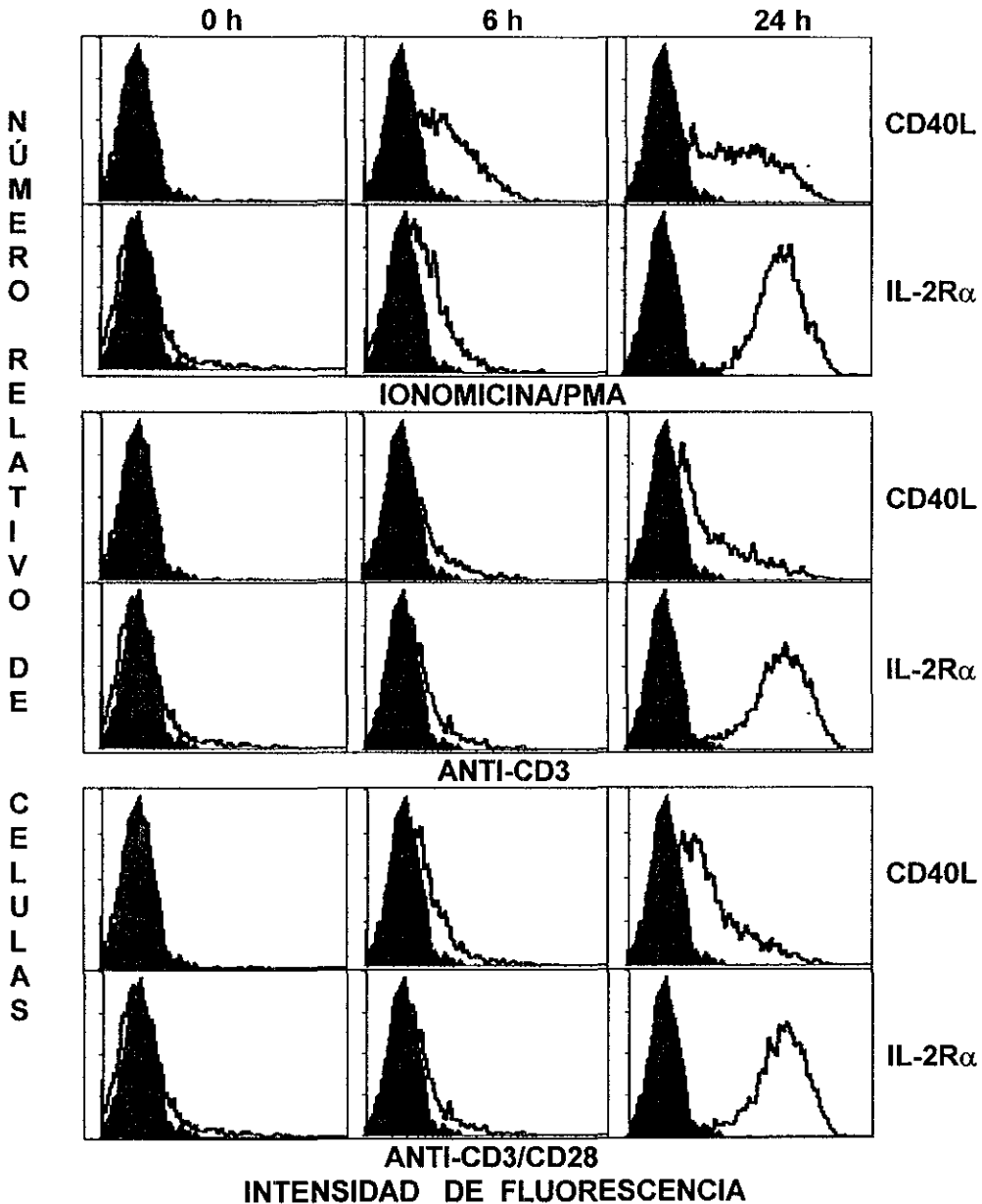


FIGURA 13. Cinética de expresión del IL-2R α y CD40L en LT de sangre periférica. LT fueron purificados por la formación de rosetas y activados con los diferentes estímulos que se muestran a las 6 y 24 horas. Desplazamientos de la intensidad de fluorescencia que producen los Acs dirigidos contra las moléculas en estudio en citometría de flujo, tomando como control un Ac irrelevante (histograma oscuro).

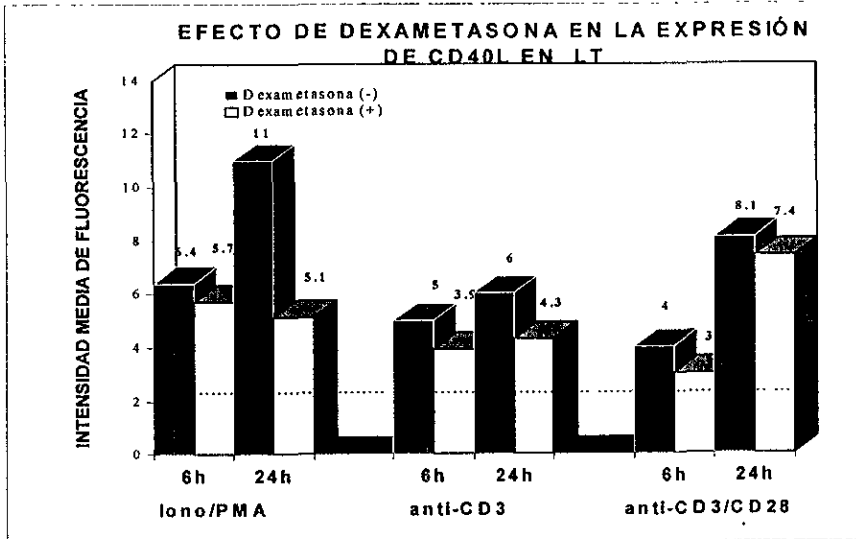
7.2.6.- EFECTO DE LA DEXAMETASONA EN LA EXPRESIÓN DEL CD40L Y EL RIL-2 α EN LT DE SANGRE PERIFÉRICA.

El efecto de la dexametasona también se estudió a las 6 y 24 h. Así, para el el CD40L se puede apreciar que la inhibición con dexametasona fue significativamente mayor cuando los LT fueron activados con Ionomicina/PMA que con anti-CD3 o aún con anti-CD3/CD28 mostrando en éste último caso una discreta inhibición. Para el RIL-2(α) se observó que la dexametasona tiene una muy discreta inhibición en su expresión bajo el estímulo de Ionomicina/PMA o anti-CD3 pero cuando se utiliza anti-CD3/CD28 se observa una importante inhibición en la expresión (**Figura 14**).

Se pudo observar que la expresión del RIL-2(α) y el CD40L puede ser inhibida por la dexametasona significativamente, dependiendo del estímulo que utilizemos para la activación de LT. Sorprendentemente, la expresión del CD40L no fué inhibida significativamente por la dexametasona, mostrándose una inhibición muy discreta, cuando LT son activados con anti-CD3/CD28.

Con la finalidad de descartar la posibilidad de que ésta discreta inhibición fuera la responsable de la ausencia de la disminución de IgG en los cocultivos LT-LB, o bien que la dexametasona afecta a la interacción CD40-CD40L, se estudió el efecto de los glucocorticoides en la interacción CD40-CD40L en los cocultivos LT-LB.

A



B

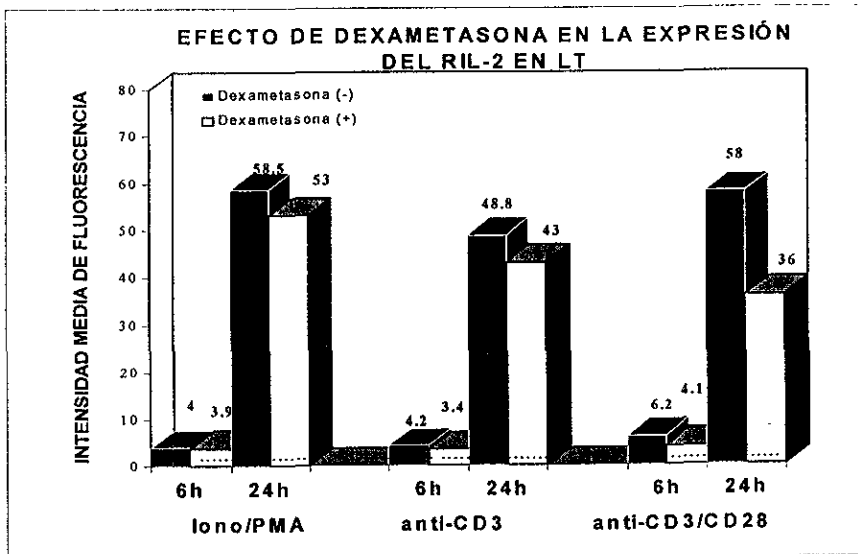


FIGURA 14. Efecto de la dexametasona en la expresión del CD40L (A) y el RIL-2 α (B) en LT de sangre periférica. LT fueron aislados de voluntarios sanos por la formación de rosetas y fueron activados con los diferentes estímulos que se muestran y cultivadas en presencia (□) ó ausencia (■) de dexametasona (10^{-7} M) a las 6 y 24 horas (t=0: línea punteada). Valores obtenidos de análisis de citometría de flujo (resultados representativos de 3 experimentos independientes).

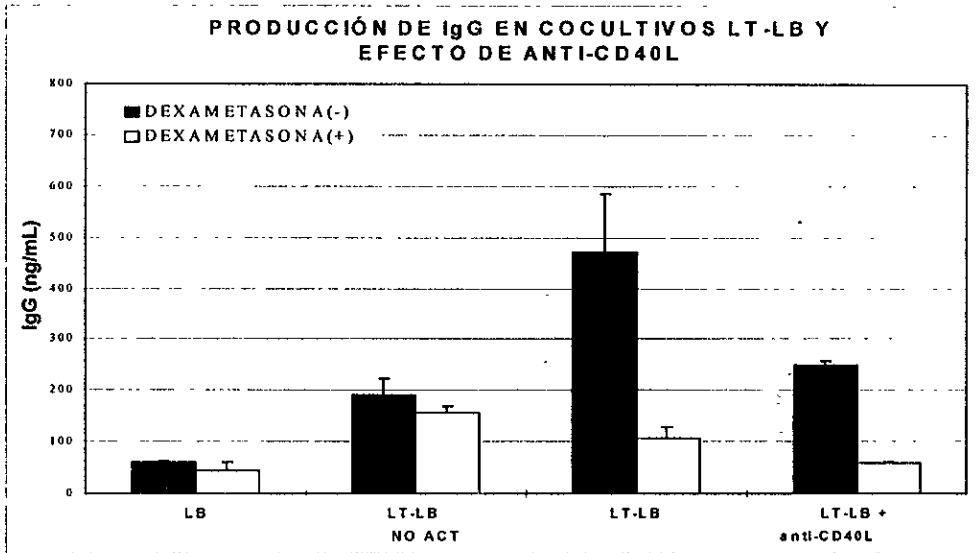
7.3.- EFECTO DE LA DEXAMETASONA EN LA INTERACCIÓN

CD40-CD40L.

7.3.1.- EFECTO DE ANTI-CD40L EN COCULTIVOS LT-LB

Con los estudios anteriores no podemos asegurar que la disminución de la producción de IgG por dexametasona se haya debido a una ausencia en el cambio de isotipo, posiblemente secundaria a inhibición de la expresión del CD40L en LT (anteriormente demostrada su expresión). Por tal motivo se estudió la producción de Igs en presencia de un agente bloqueador de la interacción CD40-CD40L: un mAc anti-CD40L (clona 24-31) en presencia o ausencia de dexametasona. Así, en la **Figura 15** se puede apreciar que la concentración de IgM es superior a la de IgG y que ésta última se obtiene sólo cuando los LT son activados. Para la IgG la presencia de anti-CD40L disminuye hasta casi el 50% la concentración que se encuentra cuando LT son activados y cocultivados con LB. Se puede apreciar que la dexametasona disminuye la producción de IgG tanto en ausencia como en presencia de anti-CD40L, y en éste último, se observa un efecto aditivo a dicha disminución. Lo anterior sugiere que la dexametasona ejerce una disminución de la producción de IgG independientemente de la interacción CD40-CD40L. Para IgM se observa, sorprendentemente, que la presencia de anti-CD40L disminuye su producción y la dexametasona de igual manera tiene un efecto adicional e independiente a ésta inhibición. Por lo tanto, ésta disminución sea solo un efecto inhibitorio y no ausencia del cambio de isotipo.

A



B

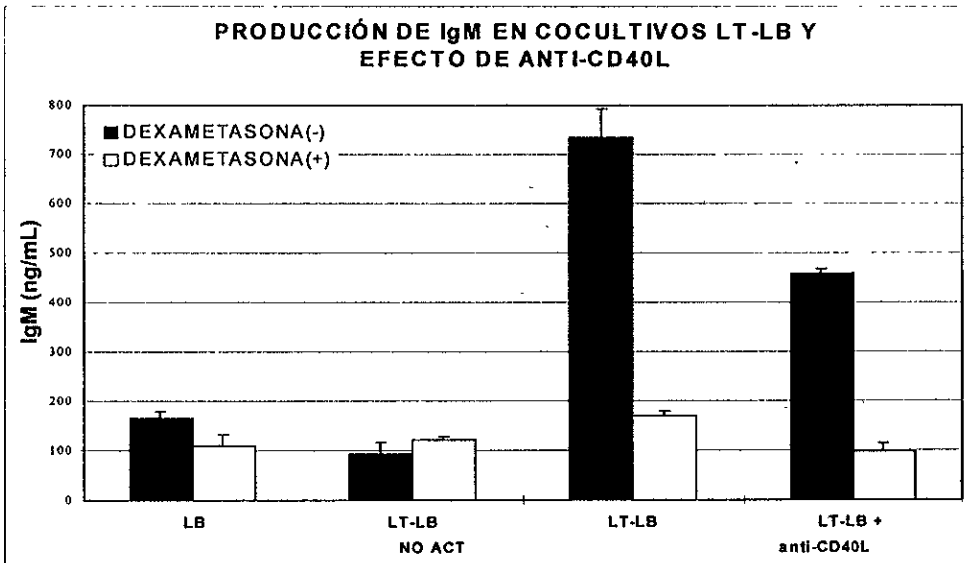


FIGURA 15. Efecto de la dexametasona en la producción de IgG (A) e IgM (B) y el efecto de anti-CD40L. Determinación de Igs por ELISA isotipo específica de SN de 10 días de cocultivo LT-LB en presencia o ausencia de dexametasona y efecto del bloque de la interacción CD40-CD40L con un anticuerpo anti-CD40L (10 µg/mL). Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

7.3.2.- EFECTO DE CD40 QUIMÉRICA EN LA ACTIVACIÓN DE LB VÍA CD40.

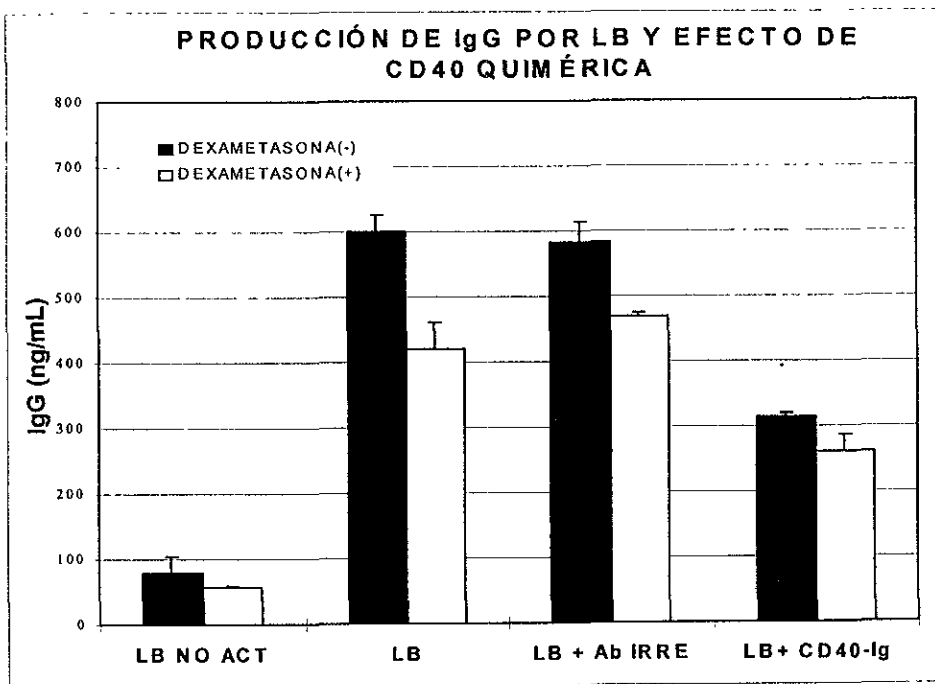
Con la finalidad de estudiar si la producción de IgG e IgM es afectada por el bloqueo de la estimulación de LB vía CD40, se estudió un sistema mas particular y específico: el efecto de la dexametasona en la activación de LB con anti-CD40 en presencia o ausencia de un agente bloqueador de dicha activación.

Los LB se activaron con mAbs anti-CD40 en presencia o ausencia de dexametasona con o sin una molécula quimérica bloqueadora, CD40-fragmento Fc de inmunoglobulina (CD40-Ig). Como se mencionó en los antecedentes, FC γ RIIb1 en la superficie de LB puede mandar señales de regulación negativa, por lo que para éste sistema se introdujo la presencia de un Ac irrelevante anti lisozima (IgG1) para poder observar el efecto deseado.

Como lo muestra la **Figura 16**, los LB necesitan ser activados con mAbs anti-CD40 para poder producir Igs. La concentración inicial de IgG es menor en comparación con IgM pero cuando los LB se activan, éstos secretan mayor cantidad de IgG que de IgM. En presencia de dexametasona los LB disminuyen la producción tanto de IgG como de IgM. Cuando colocamos la molécula bloqueadora, CD40-Ig, los niveles de IgG disminuyen mientras que los de IgM aumentan (pero no cuando se coloca un Ac irrelevante).

Lo anterior probablemente se debe a la ausencia del cambio de isotipo, al competir CD40-Ig por los mAbs anti-CD40. Se podrá notar que la secreción de IgG es mayor cuando los LB se activan en presencia de dexametasona que cuando son activados solamente en presencia de CD40-Ig y que la dexametasona, en este último caso, no tiene efectos aditivos significantes. En el caso de IgM, cuando los LB se activan en presencia de dexametasona y CD40-Ig, existe una disminución en su producción, la cual no es mayor a la que se produce cuando los LB son activados en ausencia de CD40-Ig.

A



B

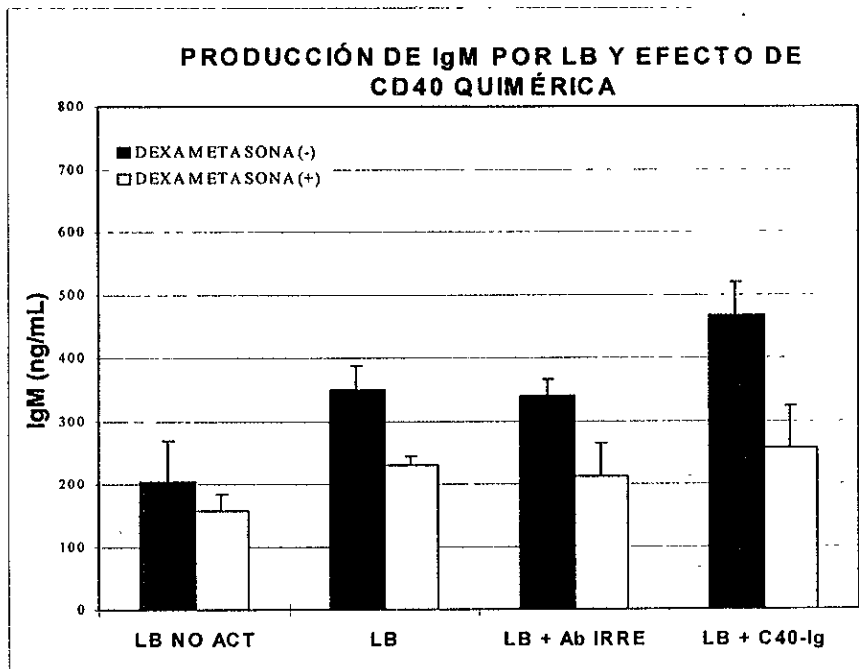


Figura 16. La dexametasona ejerce un efecto independiente de la estimulación de LB vía CD40 en el cambio de isotipo. LB fueron activados con anti-CD40 inmovilizado con o sin CD40 quimérica en presencia o ausencia de Dexametasona y cultivados durante 10 días. De los SN se determinó la concentración de IgG (A) e IgM (B) por ELISA isotipo-específica.

8.- DISCUSIÓN

Las acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras de los glucocorticoides, están ampliamente descritas en la literatura, y consisten, en general, en la alteración del tráfico leucocitario, el decremento de las funciones leucocitarias y las alteraciones en una variedad de factores humorales. Aunque un tratamiento corto con dosis altas de glucocorticoides en humanos, puede disminuir los niveles séricos de Inmunoglobulinas durante 2 a 4 semanas, el efecto en la respuesta inmune humoral puede ser variable. Entre los factores que contribuyen a ésta variabilidad pueden ser la dosis de glucocorticoides que se administra, la naturaleza del estímulo antigénico y el tipo de respuesta (primaria o secundaria)²⁸. En el presente trabajo de investigación se demostró claramente que la dexametasona, a una concentración tisular y a dosis utilizadas en la práctica con estímulos que mimetizan la activación de los linfocitos T via su TCR y la coestimulación através de CD28, es capaz de disminuir *in vitro* tanto la secreción de inmunoglobulinas como el cambio de isotipo.

Se ha sugerido que el mecanismo de la supresión de la producción de inmunoglobulinas *in vivo* por glucocorticoides es el resultado de un aumento en el catabolismo de las Igs, seguido de una disminución de su síntesis. Aunque el mecanismo de ésta última no ha sido bien definido, se ha propuesto que los glucocorticoides afectan las funciones de los linfocitos T inductores. Estudios *in vitro* han demostrado la supresión de la producción de IgM por los glucocorticoides, y se ha postulado que esa supresión es ocasionada a una disminución de la secreción de IL-6

^{34,35}. Nuestra hipótesis inicial planteó que los glucocorticoides disminuyen la producción de las inmunoglobulinas a través de la inhibición de la expresión del CD40L, sin embargo la dexametasona tuvo efectos muy discretos en dicha inhibición, utilizando el mismo sistema de activación (anti-CD3/CD28).

La inhibición de la secreción de IL-2 con glucocorticoides es secundaria a la inactivación del factor de transcripción NF- κ B por un aumento en la síntesis de I κ B que se secuestra a NF- κ B en el citoplasma. Se sabe que el promotor del gen del IL-2R α humano comprende elementos que también unen al factor de transcripción NF- κ B. Además, se ha reportado que la transcripción máxima y sostenida del gen IL-2R α es modulada principalmente por la IL-2 por sí misma. Mediante los ensayos de proliferación se pudo comprobar, en linfocitos T, la inhibición de la secreción de IL-2 y con los ensayos de activación anti-CD3/CD28, se encontró una disminución en la expresión del IL-2R α en presencia de la dexametasona (Figs. 2 y 9). Por lo contrario, cuando utilizamos ionomicina/PMA como agentes estimuladores, no se encontró una apreciable inhibición. Se ha reportado la inhibición de la expresión del IL-2R α en linfocitos T hasta en un 60% con glucocorticoides ³⁶, sin embargo, en dichos estudios se utilizaron PHA /PMA como activadores y la concentración de trabajo de la dexametasona fué 10 veces mayor a la utilizada en nuestro estudio. Contrariamente, existen reportes que apoyan, lo aquí encontrado, donde se demuestra que la expresión de la cadena α del receptor del IL-2 no es inhibida por glucocorticoides ³⁷. En esos estudios utilizaron PMA como activador y la concentración de dexametasona fué también 10 veces mayor a la utilizada (10^{-6} M) en nuestro trabajo.

Lo anterior sugiere que el efecto de la dexametasona en la expresión del IL-2R α está en función del estímulo que se utilice y de la concentración de la dexametasona.

El promotor del CD40L contiene elementos que permiten la unión de factores de transcripción tales como NF- κ B, NF-IL6, AP-1, etc., que permiten la expresión del gen. Además, se ha propuesto un ciclo de regulación positiva en la expresión de CD40L, donde participa CD28 para aumentar su expresión. Por otro lado, se ha descrito que los glucocorticoides interfieren con los eventos tempranos de la transducción de señales generadas por la interacción TCR-MHC-Ag. Dentro de éstos eventos se encuentran la supresión de la movilización del calcio y de la hidrólisis del PI₃^{38,39}. De manera contraria a la señalización por el TCR, la señalización a través de CD28 es independiente de los incrementos de calcio intracelular o de la hidrólisis del PI₃¹².

En este trabajo se pudo observar que la expresión del ligando de CD40 cuando los linfocitos T son activados con anti-CD3/CD28, no fué inhibida por la dexametasona, o bien la inhibición fué muy discreta (Figura 15 A), mientras que, cuando los linfocitos T fueron activados con ionomicina/PMA se observó una inhibición importante. Así, en la expresión del CD40L donde intervienen diversos y complejos eventos, los cuáles fueron mejor mimetizados por el estímulo anti-CD3/CD28, aparentemente no son reprimidos por los glucocorticoides. Aunque la estimulación que se ejerce con ionomicina/PMA induce una mejor expresión del CD40L, no se mantiene un ciclo de regulación positiva en dicha expresión y los eventos que generan son sensibles a los glucocorticoides, por lo cual la dexametasona inhibe claramente su expresión. Los resultados anteriores

indican que la señal coestimuladora generada por anti-CD28 es sinérgica a anti-CD3 y para la expresión del CD40L y que esta combinación no es sensible a la acción de los glucocorticoides.

Aunque las células Jurkat representan un sistema útil y versátil para diversos estudios con linfocitos T y se ha demostrado la inhibición de la secreción de IL-2 por la dexametasona, el patrón de expresión del ligando de CD40 y la cadena α del receptor de IL-2 fué muy diferente a lo observado con los linfocitos T, utilizando los mismos estimuladores. Lo anterior lo podemos relacionar con la alta variabilidad genética que presentan, ya que es una línea celular pseudodiploide (hasta con un 5.3 % de poliploidía)³². Así, los efectos de los glucocorticoides en la expresión del CD40L ó IL-2R α en células Jurkat no pueden ser comparables con los que suceden en linfocitos T de sangre periférica de individuos sanos.

Se ha observado que la adición de anticuerpos bloqueadores de la interacción CD40L-CD40 en sistemas LT-LB, tales como anticuerpos monoclonales anti-CD40 soluble ó anti-CD40L, inhiben profundamente la secreción de las inmunoglobulinas⁴⁰. En el presente estudio, se observó que la presencia de anticuerpos monoclonales anti-CD40L en cocultivos de LT-LB disminuyó tanto la secreción de IgM como de IgG. Sorprendentemente la dexametasona tuvo efecto aditivo a la presencia del anti-CD40L, sugiriendo que la dexametasona ejerce una acción independiente de la expresión del

CD40L para la disminución de la secreción de las inmunoglobulinas, lo cual puede correlacionarse con la escasa inhibición de la expresión del CD40L en linfocitos T.

El efecto de la dexametasona sobre la activación de los linfocitos B vía el CD40 se pudo observar cuando se utilizó la molécula químerica CD40-Ig. En dichos experimentos (Figura 16) la dexametasona, en presencia de CD40 quimérico, no mostró efecto aditivo en la disminución del cambio de isotipo; con lo cual podemos deducir, que la dexametasona no afecta la transducción de señales vía CD40 en los linfocitos B para el cambio de isotipo (IgM a IgG).

Dentro de las diversas acciones que los glucocorticoides podrían ejercer sobre los linfocitos T en los cocultivos T-B, se encuentran la supresión de la secreción de interleucina-2 y su receptor de alta afinidad (IL-2R α), que son indispensables para la proliferación celular, y la supresión de la producción de las interleucinas 6 y 4, las cuales son necesarias para el cambio de isotipo.

De ésta manera, las acciones inmunosupresoras celulares de los glucocorticoides *in vivo* junto con las anteriormente descritas, disminuyen la producción de inmunoglobulinas; sin embargo, no disminuyen la expresión del CD40L ni la transducción de señales generadas por CD40

El presente trabajo apoya la línea de investigación CD40-CD40L en enfermedades autoinmunes (LES), que actualmente se está desarrollando. Dentro de los estudios que se realizan se encuentran, la búsqueda de la expresión espontánea de CD40L en linfocitos de pacientes con LES activo y la producción de Igs en LB de dichos pacientes. Uno de los problemas que frecuentemente se presentaba era el discriminar si los pacientes con tratamiento de glucocorticoides podían ser sometidos a dichos estudios. Con la presente tesis podemos descartar la posibilidad que los glucocorticoides disminuyan la expresión del CD40L.

9.-CONCLUSIONES

Con los estudios realizados en la presente tesis se pueden concluir los siguientes puntos:

Los glucocorticoides disminuyen *in vitro* la producción de diferentes isotipos de inmunoglobulinas (IgM e IgG).

Los glucocorticoides disminuyen la expresión de la cadena α del receptor de interleucina 2 en linfocitos T de sangre periférica cuando son activados con anticuerpos anti-CD3/CD28.

Los glucocorticoides disminuyen la expresión del ligando de CD40 en linfocitos T de sangre periférica cuando son activados con ionomicina/PMA, pero no cuando son activados con anti-CD3/CD28.

Los glucocorticoides disminuyen la producción de IgG e IgM en linfocitos B por mecanismos diferentes a la inhibición de la expresión del ligando de CD40 en linfocitos T.

Los glucocorticoides no interfieren en la señalización de linfocito B vía el CD40 para la producción de las Inmunoglobulinas.

10.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Berridge M. J., Lymphocyte Activation in Health and Disease, Critical Reviews in Immunology, 17:155-178 (1997).
- 2.- Janeway C. A. and Travers P., Immunobiology, 3a Edn., Current Biology Limited, USA 1997.
- 3.- Abbas A. K., Lichtman A. H. and Pober J. S., Cellular and molecular immunology, 5a Edn, W.B. Saunders Company, USA 1996.
- 4.- McVicar D. W., McCrady C. W. and Merchant R. E., Corticosteroids inhibit the delivery of short-term activational pulses of frobol ester and calcium ionophore to peripheral T cells, Cell. Immunol., 140: 145-157 (1992).
- 5.- Bach J-F , T-cell-directed immunointervention, Frontiers in Pharmacology and Therapeutics, Blackwell Scientific Publications, U.K. (1993).
- 6.- Mackay C. R., Imhof B. A., Immunology today, 14:99-112 (1993).
- 7.- Weiss A. and Littman D. R., Signal transduction by lymphocyte antigen receptors, J. immunol., 145 : 3348-3354 (1990).
- 8.- Rafnar T., Catipovic B., Brummet M. E., Shneck J. P. and Mersh D. G., CSK associates with the epsilon-chains and zeta-chains of the TCR via its SH2 domain, J. Allergy Clin. Immunol., 7 :312-325 (1997).
- 9.- Clark E. A. and Ledbetter J. A., How B and T cells talk to each other, Nature, 367: 425-428 (1994).

- 10.- Moreno R. J., Respuesta inmune y mecanismos autoinmunidad, Edit. Noriega, México D.F. (1996).
- 11.- Ruggiero G., Martinez C. E., Voordouw A., Noteboom E., Graf D., Kroczeck A. and Spits H., CD40 expressed on thymic epithelial cells provides costimulation for proliferation but not for apoptosis of human thymocytes, *J. Immunol.*, 156: 3737-3746 (1996).
- 12.- Rudd C. E., Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function, *Immunity*, 4: 527-534 (1996).
- 13.- Pleiman C. M. D' Ambrosio D. and Cambier J. C., The B cell antigen receptor complex: structure and signal transduction, *Immunol. Today*, 15:393-408(1994).
- 14.- Law C. L., Sidorenko S. P and Clark E. A., Regulation of lymphocyte-activation by the cell-surface molecule CD22, *Immunol. Today*, 15:442-452 (1994).
- 15.-Doody G. M., Justement L.B., DeLebritas C. C., Matthews R. J., Thomas M. L. and Fearon D. T., A role in B-cell activation for CD22 and the protein-tyrosine-phosphatase SHP, *Science*, 269 :242-245 (1995).
- 16.- Cambier J. C., Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by FC γ RIIB1, *Science*, 268: 293 (1995).
- 17.- Minami Y., Kono T., Miyazaki T. and Taniguchi T., The Il-2 receptor complex: its structure, function and target genes, *Annu. Rev. Immunol.*, 11: 245-267 (1993).
- 18.- Serdobova I., Pla M., Sperisen P., Ghysdael J., Wilson A., Freeman J. and Nabholz M., Elf-1 contributes to the function of the complex IL-2-responsive enhancer in the mouse IL-2 receptor α gene, *J. Exp. Med.*, 7:1211-1221 (1997).

- 19.- Plaetinck G., M.-C. Combe, P. Corthésy, P. Sperisen, H. Kanamori, T. Honjo and M. Nabholz, Control of IL-2 receptor- α expression by IL-1, tumor necrosis factor and IL-2, *J. Immunol*, 145: 3340-3347 (1990).
- 20.- Nourse J., Firpo E., Flanagan W. M., Coats S., Polyak K., Lee M. H., Massague J., Crabtree G. R. and Roberts J. M., Interleukin-2-mediated elimination of p27 (KIP1) cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin, *Nature*, 372: 570-571 (1994).
- 21.- Kooten Cess Van and Banchereau J., CD40-CD40 ligand: A multifactorial receptor-ligand pair, *Adv. Immunol.*, 61: 1-61 (1996).
- 22.- Grewal I. S. and Flavell R. A., The CD40 ligand, *Res. Immunol.*, 16: 59-70 (1997).
- 23.- Miyashita T., McIlraith M. J., Grammer A. C., Miura Y., Attrep J. F., Shimaoka Y. and Lipsky P. E., Bidirectional Regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactins, *J. Immunol.*, 158: 4620-4633 (1997).
- 24.- Allen R.C., Armitage R. J., Conley M.E., Rosenblatt H., Jenkis N. A., Copeland N. G., Bedell M. a., Edelhoff S., Disteché C. M., Simoneaux D. K., Fanslow W. C., Belmont J. and Spiggs M.K., CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome, *Science* 259: 990-993 (1993).
- 26.- Armitage R. J., Fanslow W.C., Strockbine L., Sato T.A., Clifford K.N., Macduff B.M., Anderson D.M., Glimpel S.D., Davis-Smith T., Maliszewski C.R., Clark E. A., Smith C. A., Grabstein K.H., Cosman D. and Spriggs M.K., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40, *Nature* 357: 80-82 (1992).
- 27.- McLellan A. D., Sorg R. V., Williams L. A. and Hart D. N., Human dendritic cells activate T lymphocytes via CD40 : CD40 ligand-dependent pathway, *Eur. J. Immunol.*, 26: 1204-1210 (1996).

-
- 28.- Boumpas DT, Glucocorticoid therapy for immune mediated diseases: basic and clinical correlates, *Ann. Intern. Med.* 119: 1198-1208 (1993).
- 29.- Scheinman R. I., Cogswell P. C., Lofquist A. K. and Baldwin A. S., Role of transcriptional activation of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in mediator of immunosuppression by glucocorticoids, *Science*, 270:283-286 (1996).
- 30.- Auphan N., DiDonato J. A., Rosette C., Helmberg A. and Karin M., Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- κ B activity through induction of $\text{I}\kappa\text{B}$ synthesis, *Science*, 270:286-289 (1996).
- 31.- Kotzin B. L., Systemic Lupus Erythematosus, *Cell*, 85: 303-306 (1996).
- 32.- Robert Hay, American Type Culture Collection, Catalogue of cell lines and hybridomas, Rockville Maryland, USA 1993.
- 33.- Coligan J. E., Kruisbeek A., Margulies D. H., Sherach E. M. and Strober W., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and sons, USA 1992.
- 34.A.- Shiao R.T., Miglietta L., Khera S.Y., Wolfson A. and Freter C.E., Dexamethasone and suramin inhibit cell proliferation and interleukin-6-mediated immunoglobulin secretion in human lymphoid and multiple myeloma cell lines, *Leuk Lymphoma*, 17: 485-494 (1991).
- 34.B.- Shiao R. T., McLeskey S.B., Khera S.Y., Wolfson A. and Freter C.E., Mechanisms of inhibition of IL-6-mediated immunoglobulin secretion by examethasone and suramin in human lymphoid and myeloma cell lines, *Leuk lymphoma*, 21(3-4): 293-303 (1995).

- 35.- Kalashnikova E. A. and Pukhalskii A. L., The effect of low doses of dexamethasone on interleukin-2 production by human peripheral blood lymphocytes, *Biull. Eksp. Biol. Med*, 116: 68-70 (1993).
- 36.- Batuman O. A., Ferrero A. P., Diaz A., Berger B. and Pomerantz R. J., Glucocorticoid-mediated inhibition of interleukin-2 receptor alpha and beta subunit expression by T cells, *Immunopharmacology*, 27: 43-55 (1994).
- 37.- Paliogianni F., Ahuja S. S., Balow J. P., Balow J. E. and Boumpas D. T., Novel mechanism for inhibition of human T cells by glucocorticoids. Glucocorticoids inhibit signal transduction through IL-2 receptor, *J. Immunol.*, 151: 4081-4089 (1993).
- 38.- Dennis G., June C. H., Mizuguchi J., Ohara J., Witherspoon K., Finkelman F.D. and Mond J. J., Glucocorticoids suppress calcium mobilization and phospholipid hydrolysis in anti-Ig antibody-stimulated B cells, *J. Immunol.*, 139: 2516-2523 (1993).
- 39.- Baus E., Adris F., Dubois P. M., Urbain J. and Leo O., Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes, *J. Immunol.*, 156: 4555-4561.
- 40.- Callard R. E., Herbert J., Smith S. H., Armitage R. J. and Costelloe K. E., CD40 cross-linking specific antibody production by human B cells, *Int. Immunol.*, 7:1809-1815.