

11227
176



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a digitalizar en formato electrónico e impreso el presente documento de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Carlos Lenin Pliego Reyes

FECHA: 2 1º oct. 2002

FIRMA: [Signature]



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS
SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

HOSPITAL REGIONAL 1º DE OCTUBRE

“MOLÉCULAS COESTIMULATORIAS: SU
EXPRESIÓN EN PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE Y LUPUS ERITEMATOSO
SISTÉMICO CON ACTIVIDAD”

TESIS DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO EN LA ESPECIALIDAD DE MEDICINA
INTERNA

PRESENTA:

DR. CARLOS LENIN PLIEGO REYES

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

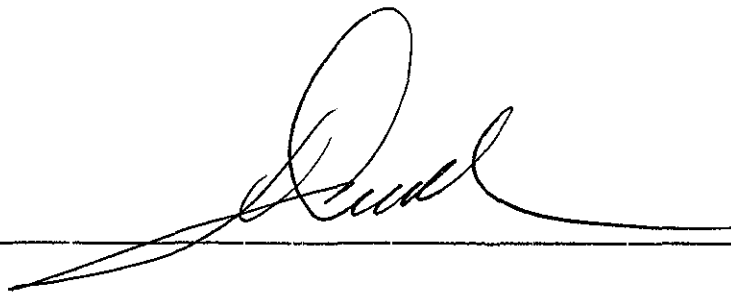


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

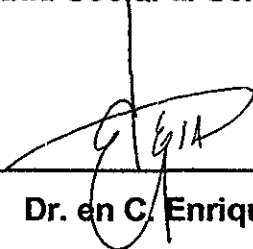


Dr. Octavio Curiel Hernández

Profesor titular del curso de especialización de Medicina Interna.

Hospital Regional 1° de Octubre

Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores de Estado

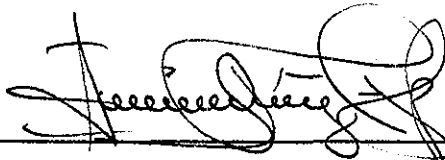


Dr. en C. Enrique Rojas Ramos

Medico Adscrito al Servicio de Inmunología Clínica y Alergia.

Hospital Regional 1° de Octubre.

Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado



Dr. Enrique Núñez González

Coordinador de Enseñanza e Investigación.

Hospital Regional 1° de Octubre

Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado.
SUBDIRECCION MEDICA

12 SEP 2002

HOSP. REG. 1° DE OCT. COORDINACION
DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

Dr. Alejandro Mondragón Sánchez

Jefe de Investigación

Hospital Regional 1° de Octubre

Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores de Estado



A MIS PADRES:

Por enseñarme la riqueza del ser humano.
Por su ejemplo de honestidad y sencillez.
Por la vida misma.

A ERNESTO CHE:

Por ser amigo incondicional.
Por su apoyo y comprensión.
Por ser ejemplo de conocimiento, amor y entereza.
Por ser mi hermano.

A ALFONSO RUSSLAN :

"In memoriam".

A MIS HERMANOS:

Por hacerme sentir cada vez mas firme en mis decisiones.

A MI ALMA MATER:

Por el amor que tengo a mi profesión.

A MIS MAESTROS:

Por levantarme del camino de la ignominia.

A LOS PACIENTES:

Por ser fuente de conocimiento inagotable y siempre amigos.

A MIS AMIGOS:

Por el recuerdo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice:

Resumen. Objetivo. - Métodos. - Resultados. - Conclusiones.	1
Summary.	3
Introducción.	4
Material y Métodos.	6
- Sujetos.	6
- Pruebas Inmunológicas.	7
- Separación de células mononucleares de sangre periférica.	7
- Doble inmunofluorescencia directa.	7
- Análisis de citometría de flujo.	8
- Análisis estadístico.	8
Resultados.	10
Discusión y conclusiones.	12
Referencias.	15
Tablas y figuras.	21

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen:

Hay amplia evidencia que la célula T juega un papel fundamental en la patogénesis de la Artritis Reumatoide (AR) y el Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Por un estímulo aún no conocido hay activación a través de receptores de membrana en la superficie de células T, y células presentadoras de antígeno (APCs). Seguido de la activación de las APCs, se activan también, las vías de coestimulación, incluyéndose a la familia B7, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) reconociendo a CD28 y CTLA-4 (CD152), por lo que se considera parte fundamental para la activación de linfocitos auto reactivos.

Objetivo: correlacionar marcadores celulares de superficie CD4+ T CD28, CD152 y CD154 y moléculas coestimuladoras pertenecientes a la familia B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), en APCs como monocitos (CD14+) y células B (CD19+), en células de sangre periférica en pacientes con AR y LES con actividad del padecimiento.

Métodos: estudio transversal comparativo en pacientes con AR y LES activos y sujetos sanos.

Resultados: en todos los pacientes, las células T, CD4+, CD28+ mostraron disminución; se encontró aumento de CD4+, CD152+ solamente en pacientes con LES; CD80+ y CD86+ así como, CD14+ y CD19+ mostraron aumento en sus niveles, predominantemente en pacientes con LES. CD14+, CD86+ mostraron buena correlación negativa con la actividad de la AR.

CD19+, CD80+, tuvo buena correlación de acuerdo al índice de actividad en pacientes con AR. Finalmente CD154+ mostró elevación, predominantemente en pacientes con LES.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Conclusiones: las vías de coestimulación, participan de manera esencial en la activación y regulación del sistema inmune durante la actividad de la AR y LES, por lo que pueden ser utilizadas para monitoreo de la actividad de la enfermedad, el agrupamiento de pacientes y como dianas terapéuticas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Summary:

There's broaden evidence about T cell playing a key role in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Because an unknown signal begins the activation through cell surface receptors and antigen presenting cells (APC's), consecutive there's also an activation of co-stimulatory pathways such as B7 family, B7-1 (CD80+) and B7-2 (CD86+), knowing CD28 and CTLA-4 (CD152+), those as a main way to the activation of autorreactive lymphocyte.

Objective: correlate surface cell markers CD4+ T CD28, CD152 and CD 154 with co-stimulatory molecules belong to the family of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86), in APC's like monocytes (CD14+) and B cells (CD19+) from peripheral blood of AR and SLE flare patients.

Methods: Cross sectional study was carried out in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis patients with disease activity and also health patients.

Results: All patients , T cells CD4+, CD28+ shown down regulation; we found regulation of CD4+, CD152+ only in patients with SLE; CD80+ and CD86+ as CD14+ and CD19+ shown up-regulation preferably in SLE. CD14+, CD86+ expressed good negative correlation with RA activity.

CD19+, CD80+, were with good correlation according with scale of activity of RA. Finally CD154+ was up-regulated especially in patients with SLE.

Conclusion: Co-stimulatory pathways play an essential role in the activation and regulation of T cell immune responses in lupus and arthritis patients, so that could be used to monitoring disease activity and also to form groups of patients and to be target for therapeutic manipulation of the costimulatory system.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Introducción.

A pesar del desarrollo e investigaciones recientes, la etiología del Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y de la Artritis Reumatoide (AR), permanece aun sin dilucidarse. Factores genéticos, hormonales y ambientales se han relacionado con la patogénesis de estos padecimientos, sin embargo es evidente que se encuentra una alteración del sistema inmune como el principal factor en la etiología de la enfermedad, de tal manera que se han reportado numerosas aberraciones en pacientes con LES y AR. (1)

La activación de la célula T juega un papel fundamental y es un evento crítico que requiere de una organización celular y humoral efectiva para que se establezca la respuesta inmune. La activación de células T es esencial para el desarrollo de células T cooperadoras, promoviendo la proliferación de anticuerpos altamente específicos así como la producción y generación de células T citotóxicas y su respuesta.

De tal manera que la célula T, requiere al menos de dos distintas señales para su completa activación: una es a través del receptor de célula T (TCR), y el otro es a través de moléculas coestimuladoras.

Los sistemas de coestimulación mejor caracterizados son el CD28 y CTLA-4 (CD152) y sus ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) en células presentadoras de antígenos (APCs) (2-4)

CD28 da una señal positiva para la activación de la célula T, pero la señal a través de CTLA-4 aun es controversial. Estudios recientes sugieren que el CTLA-4 expresa una señal sinérgica con CD28 (5).

Por otro lado, CD40 ligando (CD154) presenta una estructura homóloga con el factor de necrosis tumoral (TNF), expresado por la activación de la célula T, y por lo cual es considerado marcador de la célula T, por lo que su incremento en la expresión podría contribuir fuertemente a la interacción entre células T y B, y la producción de autoanticuerpos (6-11).

De tal manera a pesar de los diversos estudios que se han realizado, aún no se ha demostrado la presencia de un marcador específico de actividad de la enfermedad durante sus cuadros de agudización de AR y LES, por lo que es de gran importancia explorar cada una de las vías de coestimulación y de esta manera no solamente establecer criterios clínicos de actividad sino también proponer criterios moleculares, y ya que una vez establecidos, intentar la modificación del curso de la enfermedad tanto en su presentación aguda como en el estado crónico, bloqueando o interactuando selectivamente sobre la vía predominante.

Material y Métodos.

Reactivos y anticuerpos: el colorante azul tripano fue adquirido de Sigma Co. (St Louis MO, USA). La solución amortiguadora de fosfato (PBS) y la solución balanceada de Hank's fue comprada a de Gibco BRL (Rockville, MD, USA).

El gradiente de separación de linfocitos fue a través de Lymphopred TM de Nycomed Pharma AS (oslo Morway). Los Anticuerpos utilizados fueron CD28-RPE de ratón antihumano, CD154-FITC de ratón antihumano, y fueron obtenidos de Serotec (Raleigh, NC, USA). CD80-PE de ratón antihumano, CD86-FITC de ratón antihumano, CD152-FITC de ratón antihumano, anti k-PE cadena ligera de rata, IgG2a-FITC de rata antiratón y IgG2b-PE de rata antiratón como controles de isótopo, fueron obtenidos de Pharmigen (san Diego, CA, USA).

Sujetos:

Se estudiaron dos grupos de pacientes de la consulta externa de Reumatología del Hospital Regional 1° de octubre, 12 pacientes portadores de AR y 12 pacientes portadores de LES, todos reunieron los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR)(23-24), además cada uno de los pacientes, se encontraba con actividad de la enfermedad al ingreso del estudio, evaluados por las escalas de MEX-SLEDAI (25) para pacientes con LES y el índice de Ritchie (26) en pacientes con AR.

El primer grupo consistió en 12 pacientes con LES (1 hombre y 11 mujeres; con rangos de edad de 15 a 38 años [media 24.5]); el grupo 2 es de 12 pacientes con AR (12 mujeres; rango de edad de 38-57 años [media 47.0]). Además de contar con un tercer grupo de sujetos sanos, de 12 sujetos sanos (12 mujeres; con rango

de edad de 19-39 años [media de 25]), sin antecedentes genéticos de enfermedades del tejido conectivo. El estudio fue aprobado por el comité de ética del hospital y cada paciente dio por escrito su consentimiento informado.

Pruebas Inmunológicas:

Dentro de las pruebas inmunológicas se incluyó determinación de anticuerpos antinucleares (ANA) con prueba de inmunofluorescencia, (células HEP2); anticuerpos de doble cadena de DNA a partir de técnica de *Crytidia Lucilae*. Además se determinaron: factor reumatoide (FR), proteína C reactiva (PCR) y determinaciones de complemento (C3 y C4), los cuales se realizaron por técnica de nefelometría (Array 360 [Beckman USA]).

Separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

CMSP fueron separadas de sangre mediante Lymphoprep (densidad 1.077) en un gradiente de centrifugación a 400g por 30 minutos a 16°C. La interface CMSP durante la fueron recuperadas, lavadas y resuspendidas en solución estéril de PBS. La viabilidad celular fue evaluada mediante la prueba de exclusión de azul tripano, bajo microscopia de luz y utilizando un hemocitómetro.

Doble Inmunofluorescencia Directa.

Las células mononucleares (1×10^6) fueron cultivadas con 10 μ l de los anticuerpos monoclonales ya señalados conjugado a los fluorocromos FITC y RPE durante 30

minutos en a 4°C en la oscuridad. Posteriormente las células fueron lavadas en dos ocasiones y resuspendidas en solución de flujo FACS para su análisis.

Análisis de Citometria de Flujo.

Las células mononucleares fueron analizadas en Citometro de Flujo (FACScalibur™) de (Becton Dickinson). Los eventos y la media de fluorescencia relativa fueron grabadas en modo lineal y logarítmico. Un mínimo de 10^4 células fueron adquiridas y analizadas utilizando el sistema Cell Quest de Becton Dickinson. La expresión de moléculas de superficie en las células mononucleares fueron exploradas utilizando los canales de fluorescencia 1 y 2 (FL1 y FL2). El porcentaje de células analizadas y la intensidad de fluorescencia fueron analizadas para cada molécula construyéndose histogramas y graficas de puntos.

Análisis Estadístico.

Los resultados fueron analizados con el programa de SPSS versión 10.0, en dónde la mayoría de datos no tuvieron una distribución normal de acuerdo a las pruebas de Kolmogrov Smirnov Y Shapiro Wilk. El porcentaje de células positivas para cada molécula fueron comparados usando pruebas no paramétricas, utilizando la prueba de Kruskal Wallis para el análisis de tres grupos y cuándo esta prueba indicaba diferencia estadísticamente significativa, los grupos (AR y LES) fueron analizados mediante la prueba de u-mann-whitney.

Las correlaciones entre las moléculas de superficie en células mononucleares y actividad de la enfermedad, fueron realizadas por Rho de Sperman. Se considero un valor de $p < 0.05$ para la significancia estadística. Los datos son expresados en

gráficas de caja, la línea central significa la mediana, la caja los percentiles 25-75 y las líneas los percentiles 10-90.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados.

Los pacientes con AR y LES tuvieron actividad de la enfermedad en el momento del estudio, la cual fue evaluada con base en a los índices de Ritchie y la escala de MEX-SLEDAI. Los datos generales de los pacientes con AR, LES y sanos se resumen en la Tabla 1. La molécula CD28+ en células T CD4+ mostraron tendencia a disminuir durante la actividad de la enfermedad ($p < 0.001$), los pacientes con LES y AR no mostraron correlación con los índices de actividad de la enfermedad ($r = -.31$) y ($r = .24$) respectivamente (figura 1). La molécula CD152+ en células T CD4+ se encontró con incremento en pacientes con LES ($p < 0.001$), con respecto a pacientes con AR y en los controles sanos no se encontró significancia estadística en su expresión. Los pacientes con LES y AR no mostraron correlación con los índices de actividad de la enfermedad ($r = .34$) y ($r = -.23$) respectivamente (figura 2). Las células T CD4+ que expresaron CD154+ mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en pacientes con LES, no sucedió lo mismo en pacientes con AR y sanos en donde no se encontró diferencia estadística. Asimismo en pacientes con AR y LES no se encontró correlación con respecto a los índices de actividad de la enfermedad ($r = -.28$) y ($r = -.26$) respectivamente (figura 3).

Las células presentadoras de antígenos CD14+ (monocitos) que expresaban CD80+, mostraron un incremento en pacientes con LES únicamente ($p < 0.001$), entre los pacientes con AR y sujetos sanos no se encontró significancia estadística en su expresión, con respecto a pacientes con LES y AR no manifestaron

correlación estadística con los índices de actividad de la enfermedad ($r=-.01$) y ($r=-.12$) respectivamente (figura 4).

Las APC CD14+ (monocitos) que expresaban CD86+ presentaron un incremento en pacientes con LES, ($p<0.001$), en la comparación de pacientes con AR y sujetos sanos no se encontró diferencia de estadísticamente significativa, en los pacientes con LES no se mostró correlación con los índices de actividad de la enfermedad ($r=-.14$) y en pacientes con AR se encontró buena correlación negativa con respecto a los índices de actividad ($r=-.65$) (figura 5).

Las APC CD19+ (células B) que expresaban CD80+ mostró un incremento en pacientes con LES ($p<0.001$), entre los pacientes con AR y controles sanos no tuvieron diferencia estadísticamente significativa, los pacientes con LES tampoco mostraron correlación con los índices de actividad de la enfermedad ($r=-.04$) y los pacientes con AR tuvieron buena correlación con respecto al índice de actividad de la enfermedad ($r=.62$) (figura 6).

Las células APC CD19+ que expresaban con CD86+ se observó un incremento solamente en pacientes con LES, con una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.001$), sin embargo en referencia a pacientes con AR y sanos no se encontró significancia estadística y asimismo en pacientes con AR y LES no encontró correlación con los índices de actividad de la enfermedad ($r=-.37$) y ($r=-.24$) respectivamente (figura 7).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión y conclusiones:

La activación de la célula T requiere de al menos dos señales para producir la activación máxima; la primera a través del complejo formado por el receptor de la célula T (CD3), y la segunda, una señal coestimuladora. Los estudios previos, han indicado que las moléculas coestimuladoras más importantes son CD28 y CTLA-4 sobre la superficie de la célula T y sus ligandos B7-1 (CD80) y B7-2(CD86) sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos.

De tal manera que el objetivo del estudio fue correlacionar marcadores celulares de superficie CD4+ T CD28, CD152 y CD154 y moléculas coestimuladoras pertenecientes a la familia B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), en APCs como monocitos (CD14+) y células B (CD19+), en células de sangre periférica en pacientes con AR y LES con actividad del padecimiento.

Analizando la literatura, encontramos en un estudio similar, realizado por Bijl M et al., quién encontró expresión de CD28 en pacientes con LES y controles, mientras que en nuestro trabajo la expresión de esta coestimuladora la encontramos disminuida tanto en AR como LES, esto puede estar relacionado principalmente por el tamaño de la muestra, además del tipo de pacientes, ya que probablemente se encuentre manipulado por manejo de inmunosupresores previos al estudio.

CD80 y CD86 en nuestro grupo se encontró incrementado principalmente en LES, con una buena correlación negativa y también una correlación buena para AR, mientras que Bijl M, encuentra disminuida la expresión de CD80 y expresión de CD86 independientemente de la actividad del padecimiento.

Durante la investigación encontramos que se presentó incremento de CD154+ principalmente en pacientes con LES con actividad, de esta manera coincide con otros estudios realizados, lo que nos daría la pauta de una nueva ruta terapéutica a llevar en nuestro medio, mediante el bloqueo de esta coestimuladora, ya que en algunos trabajos realizados en padecimientos autoinmunes ha demostrado evitar la progresión de la enfermedad.(16)

Es importante considerar que se requieren mayor número de estudios de este tipo, ya que de esta manera se logrará entender que vías son críticas para el desarrollo de estados clínicos como lo es la actividad de LES y AR, su interrelación con los estados de autoinmunidad y también es necesario conocer que vías interactúan con los inmunosupresores más utilizados. De esta manera se ha encontrado que pacientes con expresión incrementada de Bcl-2, un marcador de apoptosis, puede predecir pobre o nula respuesta terapéutica al uso de glucocorticoides en pacientes con LES (17), además, de esta manera podremos conocer marcadores moleculares de actividad de la enfermedad y así clasificar pacientes de acuerdo a cuales moléculas se encuentran sobreexpresados, concluyéndose en una diana terapéutica específica evitando efectos deletéreos de algunos modificadores de la enfermedad que no tendrían respuesta por la presencia de determinado marcador molecular.

De tal manera y debido a que aún no se ha dilucidado por completo la patogénesis de la AR y LES, así como factores relacionados con la actividad, los altos índices de morbilidad y mortalidad durante la enfermedad, ante la inexistencia de marcadores moleculares de agudización, los pocos estudios que evalúan las vías de coestimulación y que desempeñan un papel fundamental en

la activación y regulación de la respuesta inmune; es de suma importancia evaluar que moléculas de la coestimulación se encuentran sobre expresadas, así como la vía preferentemente utilizada, debido a que si determinamos este tipo de marcadores durante la actividad de la enfermedad, esto nos ayudará a monitorizar los pacientes con actividad ya que hasta el momento no hay un marcador serológico específico para estos padecimientos, así también para clasificar a pacientes con fines de riesgo y por ende intervenir en estas vías para fines terapéuticos.

Referencias:

01. Tsokos GC, Liossis SNC. Immune cell signaling defects in lupus activation, anergy and death. *Immunol Today* 1999;20:119-124.
02. Lenschow DJ, Walunas TL, Blustone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-241.
03. Gause WC, Halvorson MJ, Greenwald PLR, Linsley P, Urban JF, Finkelman FD. The function of costimulatory molecules and the development of IL-4 producing cells. *Immunol Today* 1997;18:115-119.
- 04.- Flavell AR, Hafler AD. Autoimmunity: what is the turning point. *Curr Opin Immunol* 1999;11:635-637.
05. Ellis JH, Burden MN, Vinogradov DV, Linge C, Crowe JS. Interactions of CD80 and CD86 with CD28 and CTLA4. *J Immunol* 1996;8:2700-2709.
06. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;1:405-409.
07. Krumell MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995;182:459-463.
08. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 1995;270:985-992.
09. Tivol EA, Borriello AN, Schweitzer AN, Lynch WP, Blustone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue

destruction revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3:541-545.

10. O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTLA-4. *J Immunol* 1995;154:97-105.

11. Jumper DM, Nishioka Y, Davis SL, Lipsky EP, Meek K. Regulation of human B cell function by recombinant CD40 ligand and other TNF-related ligands. *J Immunol* 1995;155:2369-2378.

12. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1272.

13. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DJ, MacShane JF, Fries NS, Cooper LA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-318.

14. Guzmán J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, et al. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992;19:1551-1558.

15. Ritchie D, Boyle JA, McInnes JM. Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med* 1968;3:393-406.

16. Daikh DI, Finck BK, Linsley PS, Hollenbaugh D, Wofsy D. Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways. *J Immunol* 1997;159: 3104-3108.

17. Becker KB, Simon RM, Bayley-Wilson JE. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9978.
18. Ginn LR, Lin J-P, Plotz PH, et al. Familial autoimmunity in pedigrees of idiopathic inflammatory myopathy patients suggests common genetic risk factors for many autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 400.
19. Caligaris-Cappio F, Bertero MT, Converso M, Stacchini A, Vinante F, Romagnani S, et al. Circulating levels of soluble CD30, a marker of cells producing Th2-type cytokines, are increased in patients with systemic lupus erythematosus and correlate with disease activity. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:339-343.
20. Ichikawa Y, Yoshida M, Yamada C, Horiki T, Hoshina Y, Uchiyama M. Circulating soluble CD30 levels in primary Sjogren's syndrome, SLE and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:759-760
21. Gerli R, Muscat C, Bistoni O, Falini B, Tomassini C, Agea E, et al. High levels of the soluble form of CD30 molecule in rheumatoid arthritis (RA) are expression of CD30+ T cell involvement in the inflamed joints. *Clin Exp Immunol* 1995;102:547-550.
22. Asselin S, Conjeaud H, Fradelizi D, Breban M. In vitro differentiation of peripheral blood T cells towards a type 2 phenotype is impaired in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1998;114:284-292.
23. Gerli R, Lunardi C, Vinante F, Bistoni O, Pizzolo G, Pitzalis C. Role of CD30+ T cells in rheumatoid arthritis: a counter-regulatory paradigm for Th1-driven disease. *Trends Immunol* 2001;22:72-77.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

24. Kanegane H, Kasahara Y, Niida A, Yachie S, et al. Expression of L-selectin (CD62L) discriminates Th1- and Th2-like cytokine-producing memory CD4+ T cells. *Immunology* 1996;87:186-190.
25. Spertini O, Schleiffenbaum B, White-Owen, Ruiz JrP, Tedder TF. ELISA for quantitation of L-selectin (CD62-L) shed from leukocyte in vivo. *J Immunol Methods* 1992;156:115-123.
26. Mason JC, Kapai P, Haskard DO. Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:519-527.
27. Carson CW, Bcall LD, Hunder GG, Jhonson CM, Newman W. serum ELAM-1 is increased in vasculitis, scleroderma and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1993;20:809-814.
28. Mitra DK, De Rosa SC, Luke A, Balamurugan A. Differential representations of memory T cell subsets are characteristic of polarized immunity in leprosy and atopic diseases. *Int Immunol* 1999;11:1801-1810.
29. Brinkmann V, Kristofic C. Massive production of Th2 cytokines by human CD4+ effector T cells transiently expressing the natural killer cell marker CD57/HNK1. *Immunology* 1997;91:541-547.
30. Walker SKL, Judge GA, Flynn S, Brocker T, Lane JLP. Co-stimulation and selection for t-cell help for germinal centers: the role of CD28 and OX40. *Immunol Today* 2000;21:333-337.
31. Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 1996;184:783-788.

32. Perez VL, Van PL, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 1997;6:411-417.
33. Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunol* 2000;101:169-177.
- 34.- Matsui T, Kurokawa M, Kobata T, Oki S, Azuma M, Tohma S, et al. Autoantibodies to cell costimulatory molecules in systemic autoimmune diseases. *J Immunol* 1999;162:4328-4335.
35. Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology* 1996;89:4:592-598.
36. Liu MF, Li JS, Weng TH, Lei HY. Differential expression and modulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1999;49:82-87.
37. García-Cózar FJ, Molina IJ, Cuadrado MJ, Marubayashi M, Peña J, Santamaría M. Defective B7 expression on antigen-presenting cells underlying T cell activation abnormalities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Clin Exp Immunol* 1996;104:72-79.
38. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD80 and CD86 are not equivalent in their ability to induce the tyrosine phosphorylation of CD28. *J Biol Chem* 1999;274:3116-3124.
39. Doty RT, Clark EA. Two regions in the CD80 cytoplasmic tail regulate CD80 redistribution and T cell costimulation. *J Immunol* 1998;161;2700-2707.

40. Tamada K, Chen L. T lymphocyte costimulatory molecules in host defense and immunologic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:164-176.
41. Berner B, Wolf G, Klaus M, Gerhard A, Reuss-Borst, Monika A. Increased expression of CD40 ligand (CD154) on CD4+ T cells as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:190-195.
42. Pizcueta JF, Ramos-Casals M, Cervera R, Garcia-Carrasco M, Navarro M, Ingelmo M, et al. Increased serum levels of soluble L-selectine (CD62L) in patients with active systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2000;119:169-174.

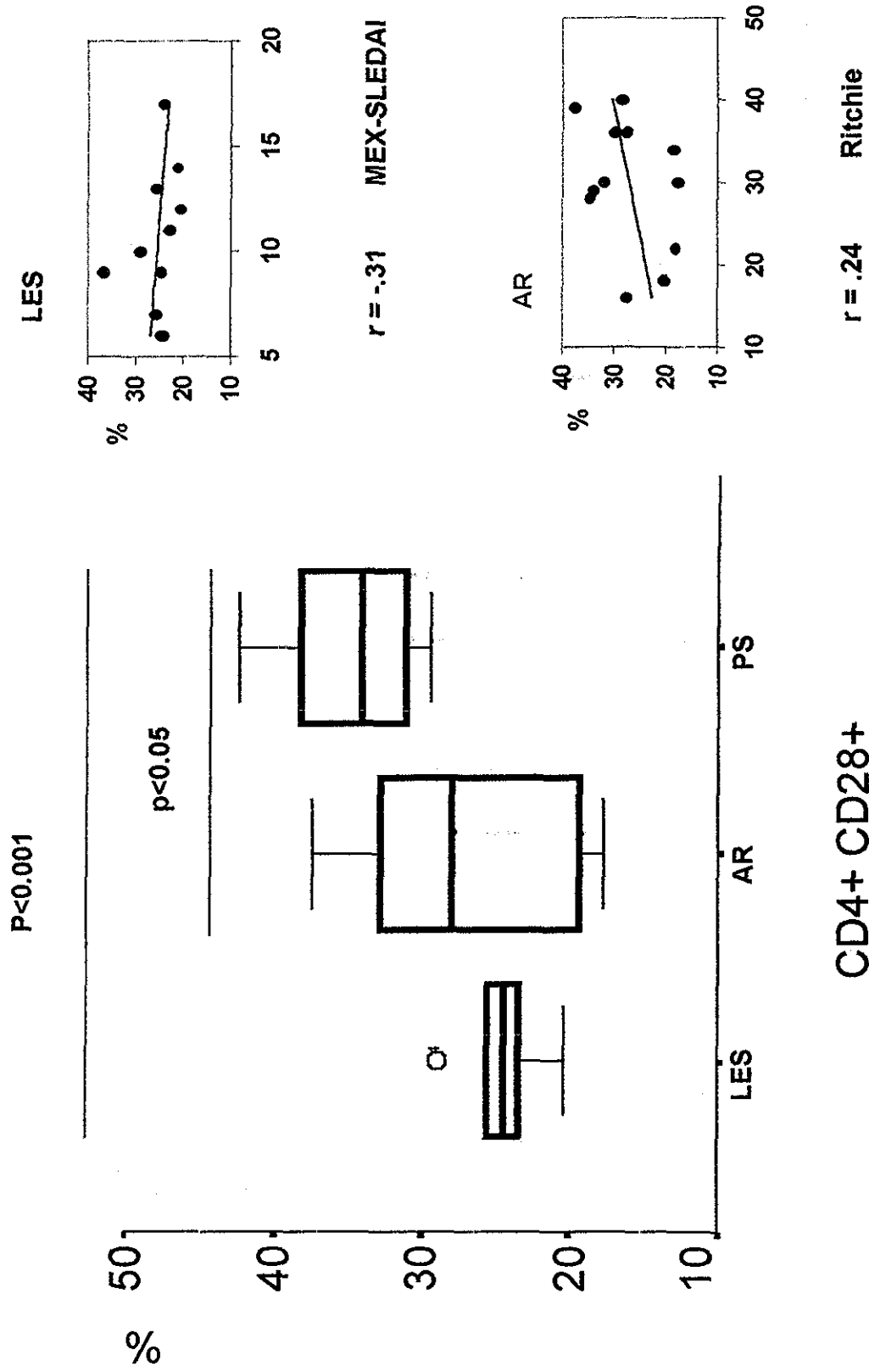
Tabla 1.

	LES	AR	PS	* Valor de P
Linfocitos T				
CD4+/CD28+	64.4	67.9	74.1	NS
CD4/CD154+	2.9	1.1	0.9	0.001
Monocitos				
CD14+/CD80+	8.3	2.7	1.8	0.001
CD14/+CD86+	10.8	6	3.9	0.006
Linfocitos B				
CD19+/CD80+	7.7	3.1	3.1	0.001
CD19/CD86+	15	3.8	3.3	0.003

Marcadores moleculares en pacientes con AR, LES y Sanos.

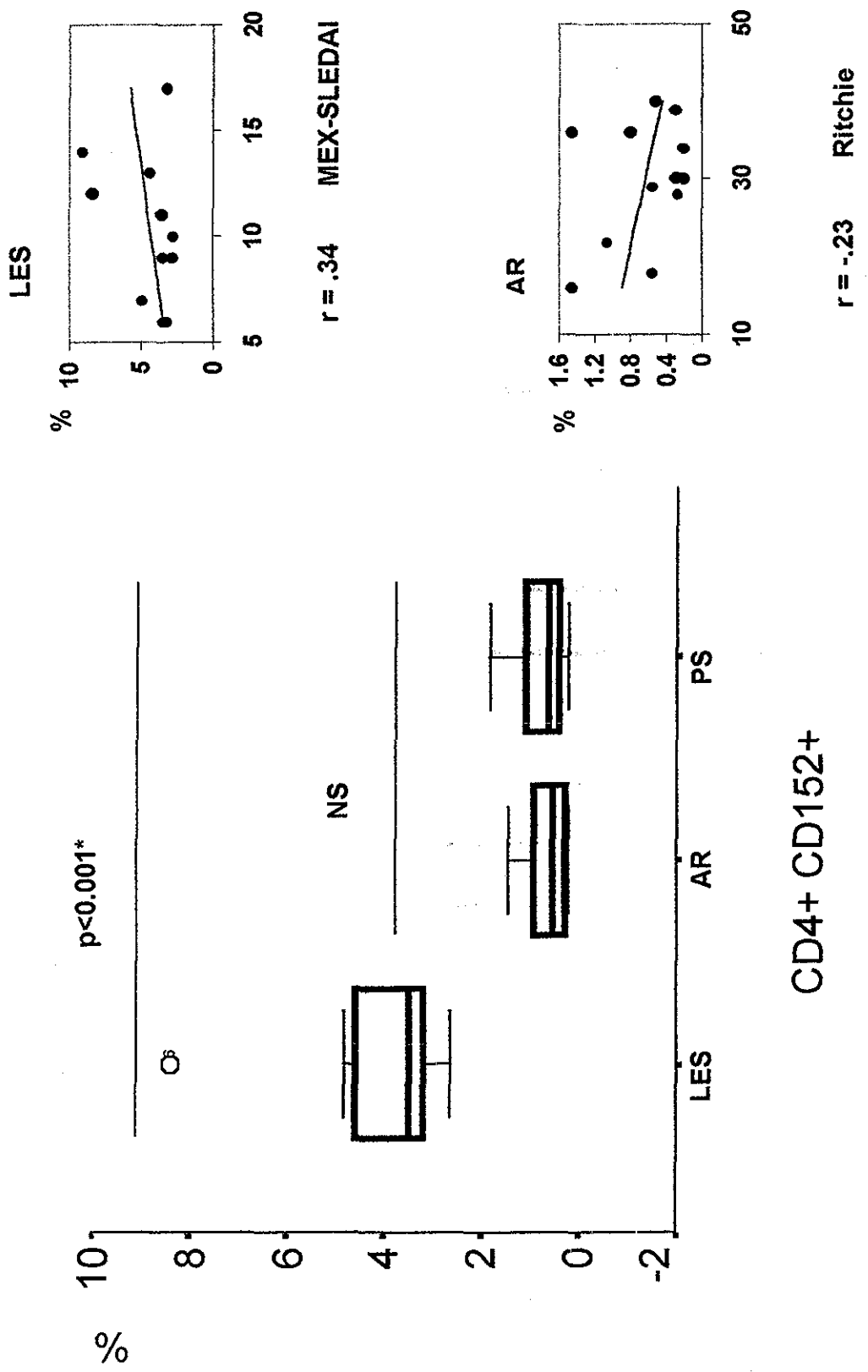
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 1.



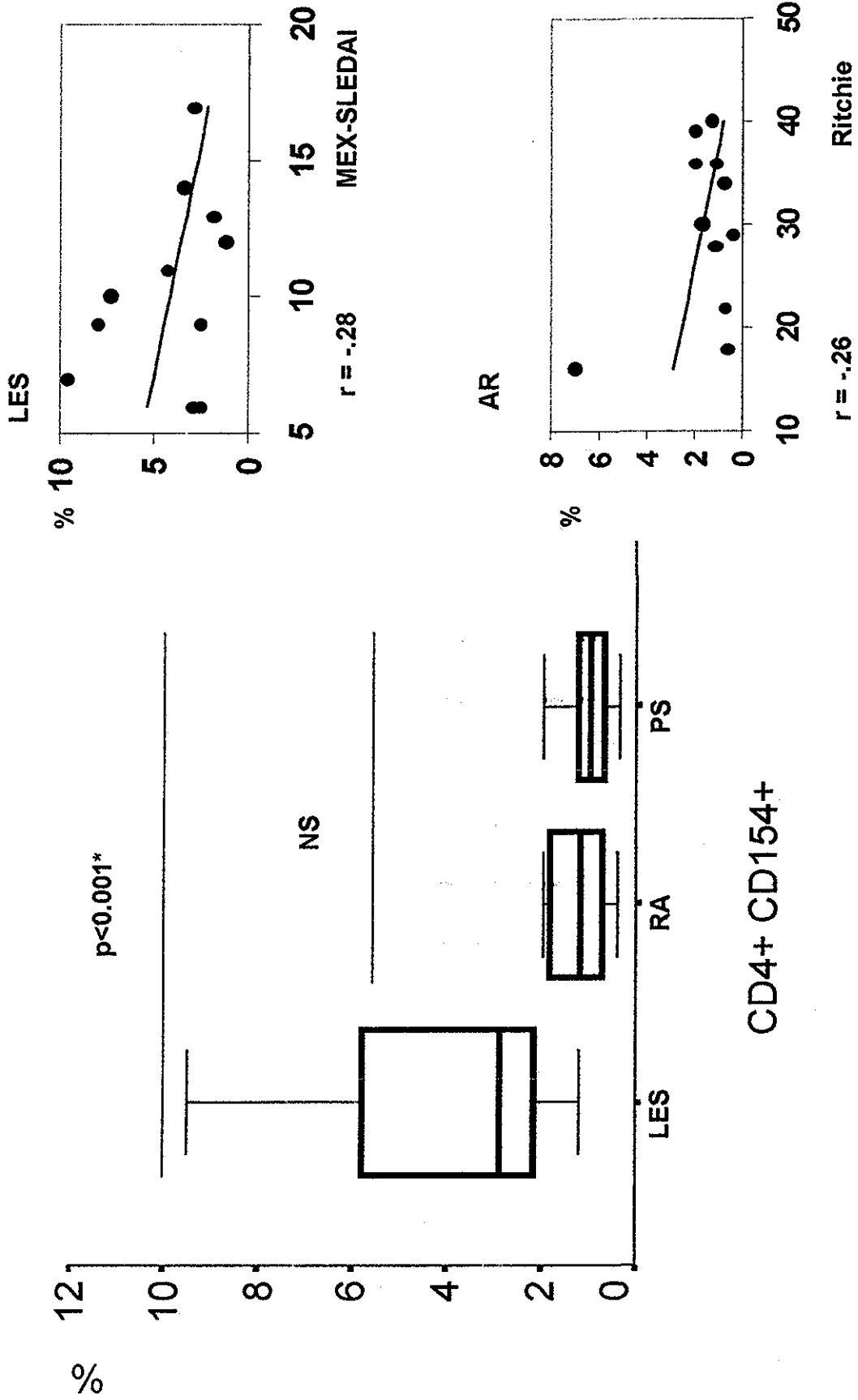
Células T CD4+ CD28+, que muestra tendencia a disminuir contrario a la actividad de la enfermedad, Además de encontrarse significancia estadística entre los tres grupos; los pacientes con LES y AR no mostraron correlación con los índices de actividad de la enfermedad.

FIGURA 2.



Células T CD4+ CD152+, mostrando incremento en pacientes con LES, con diferencia estadística significativa (p: 0.001*). Pacientes con AR y PS no mostraron diferencia estadística significativa; pacientes con LES y AR no mostrarán correlación con los índices de actividad de la enfermedad.

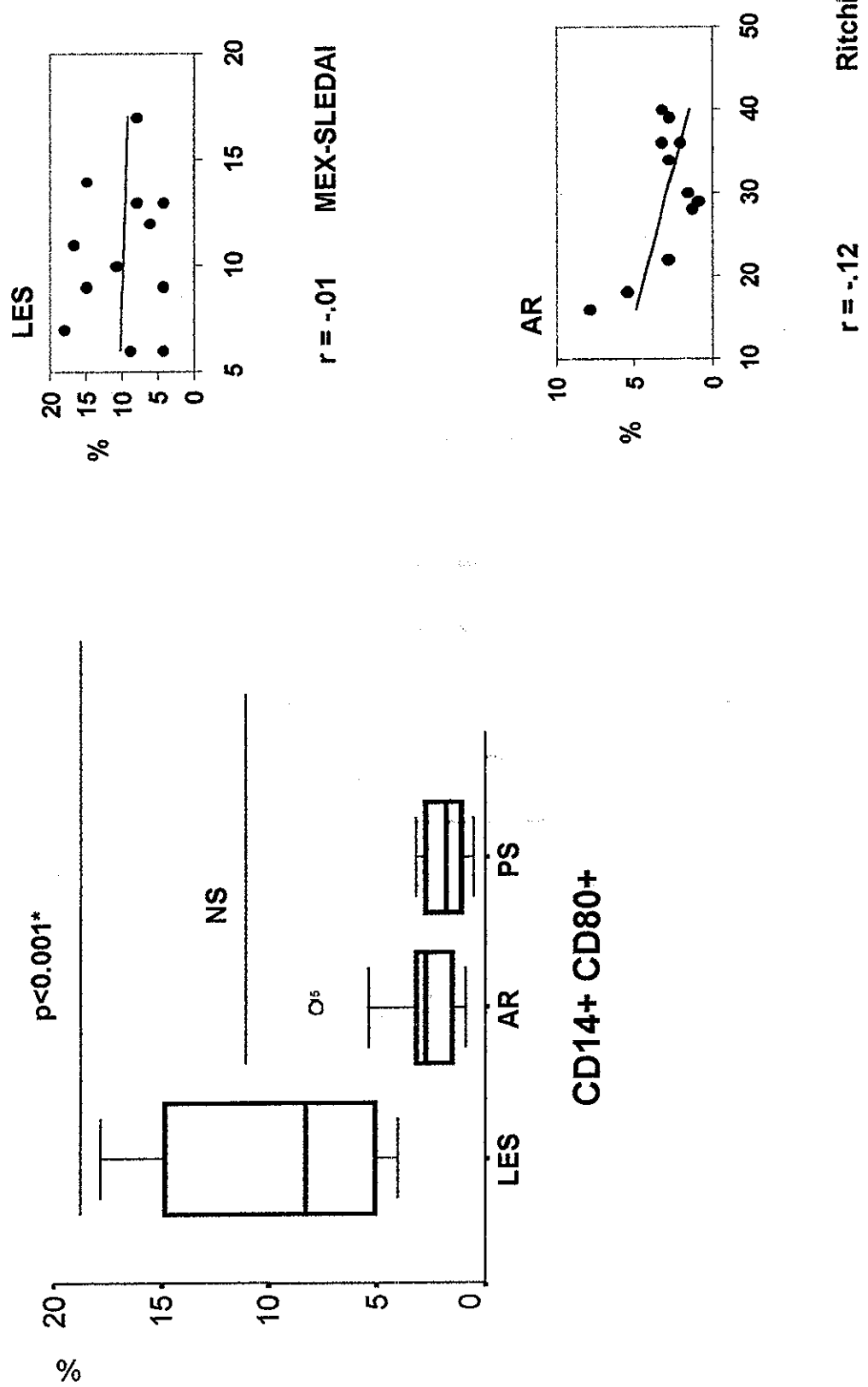
FIGURA 3.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

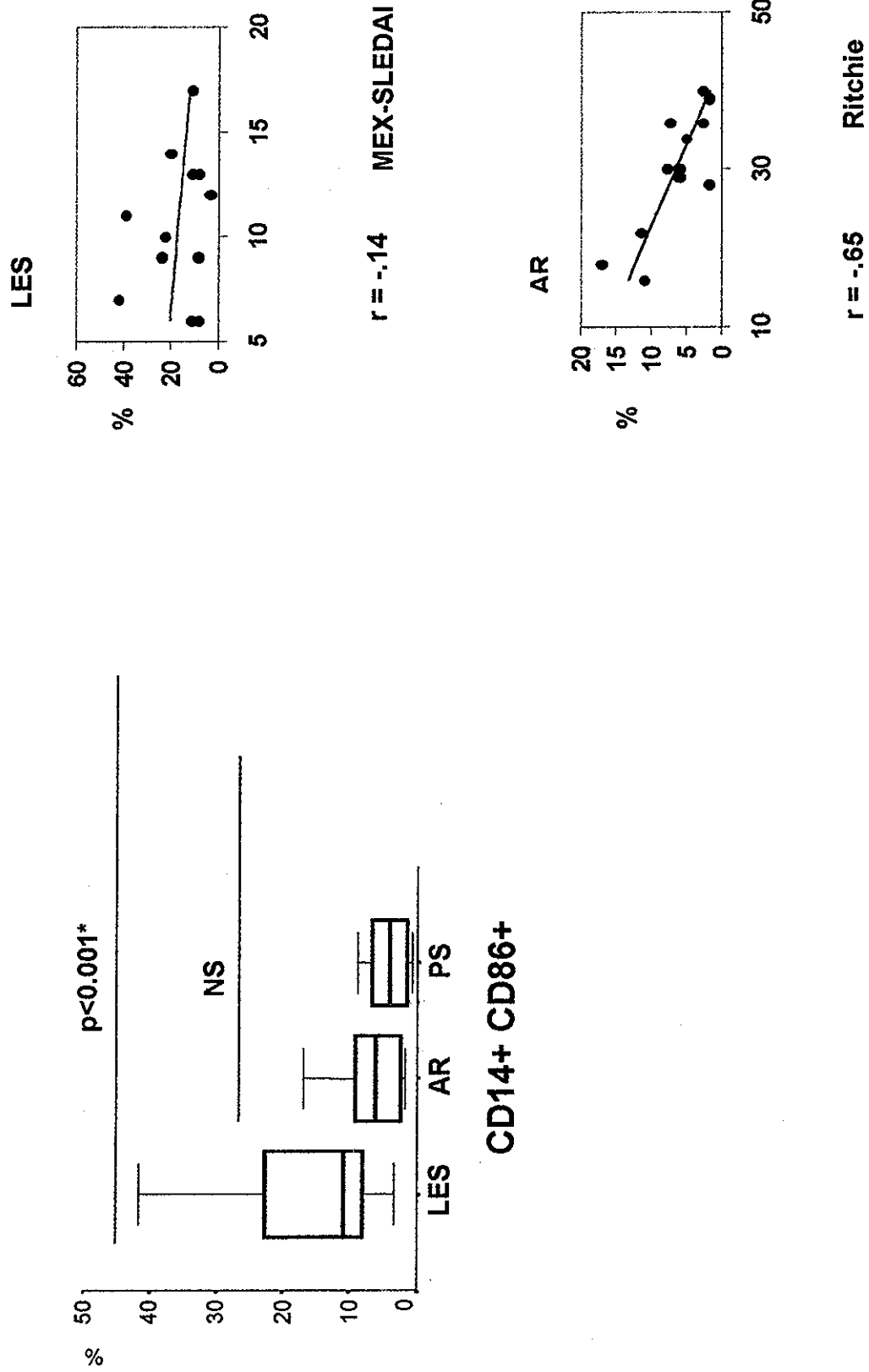
CD4+ CD154+: mostrando incremento y significancia estadística en pacientes con LES (p. 0.001*); pacientes con AR y PS no mostrarán significancia estadística. Entre pacientes con LES y AR no se encontró correlación con los índices de actividad de la enfermedad.

FIGURA 4.



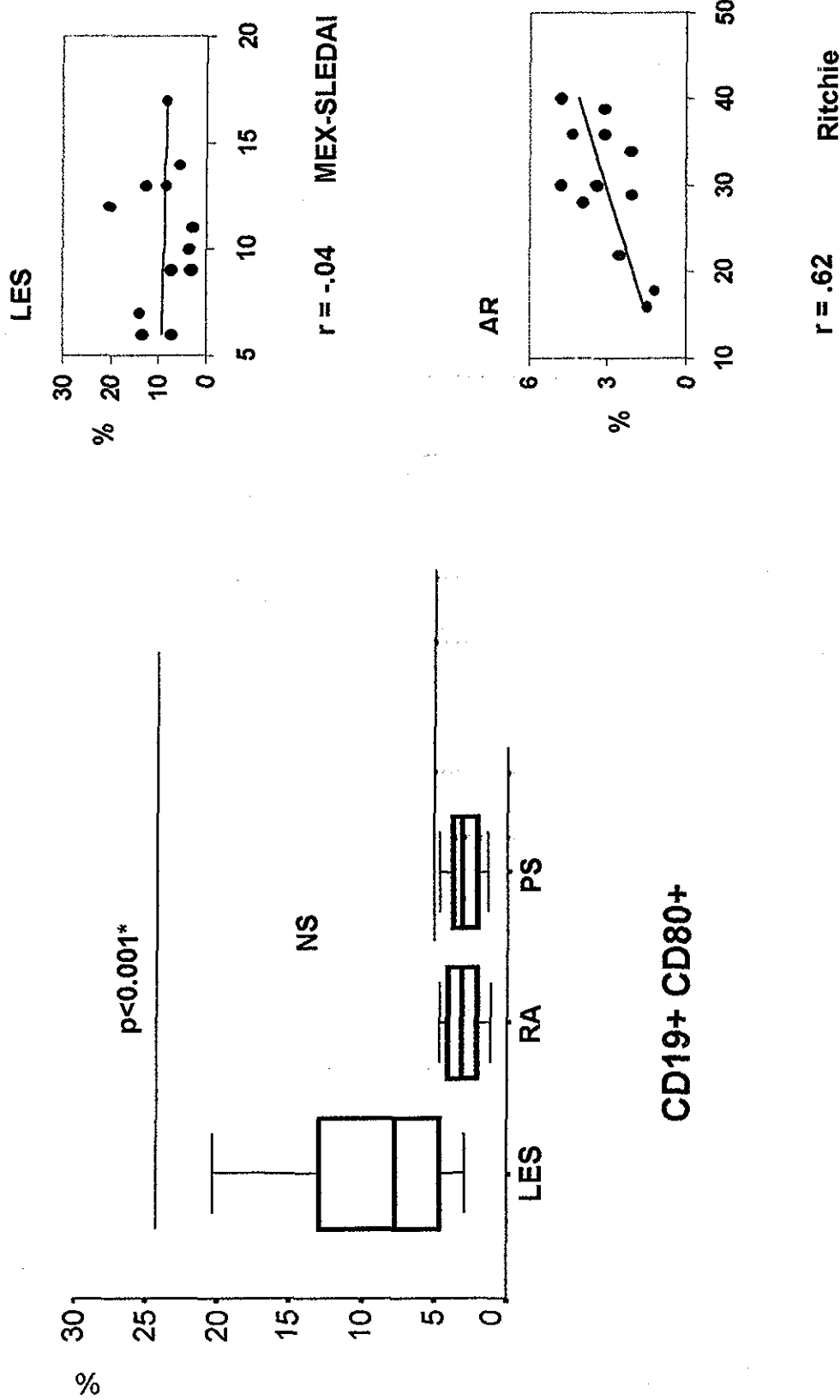
CD14+ CD80+, muestra incremento preferentemente en pacientes con LES, con significancia estadística (p: 0.001*). Entre los pacientes con AR y LES no se encontró significancia estadística, además que no mostraron correlación con los índices de actividad de la enfermedad.

FIGURA 5.



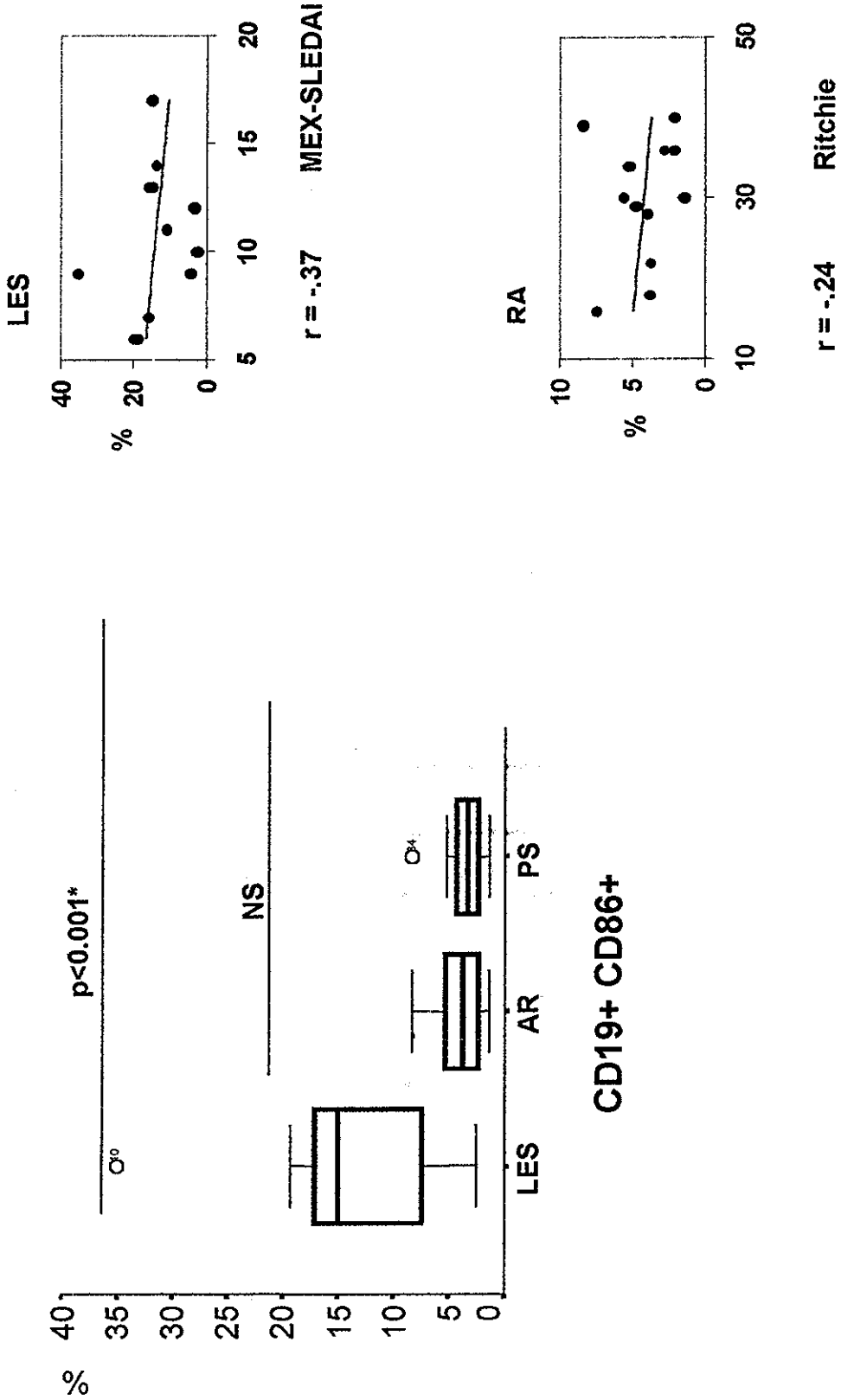
CD14+ CD86+, mostrando incremento preferentemente en pacientes con LES, con significancia estadística (p: 0.001*); respecto a pacientes con AR y PS no se mostró diferencia estadística, los pacientes con LES no mostraron correlación con los índices de actividad de la enfermedad contrariamente a los pacientes con AR que mostraron buena correlación negativa.

FIGURA 6.



CD19+ CD80+, mostrando incremento preferentemente en pacientes con LES y diferencia estadísticamente significativa (p: 0.001*); no se encontró significancia estadística entre los pacientes con LES y AR. No hubo correlación con los índices de actividad de la enfermedad en pacientes con LES, pero sí hubo buena correlación en los pacientes con AR.

FIGURA 7.



CD19+ CD86+, mostrando incremento preferentemente en pacientes con LES, así como diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos (p: 0.001); no hubo diferencia estadística entre PS y AR. Asimismo pacientes con AR y LES no mostrarán correlación entre los índices de actividad de la enfermedad.