

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

1126  
9  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EXPRESION DE CD40L (gp-39) POR LINFOCITOS  
DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES CON  
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE INMUNOLOGIA

*Biomecicas*

PRESENTA

MARTHA PATRICIA ROJO AGUILAR

MEXICO, D. F.

1999

275789

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.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Reumatología del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI, IMSS, bajo la dirección del Dr. José Moreno Rodríguez.

Con el apoyo de la beca otorgada por el IMSS desde febrero de 1994 a febrero de 1997.

Y con el apoyo de la beca de manutención otorgada por el CONACYT (registro 88212).

## AGRADECIMIENTOS

A mi Madre por darme la oportunidad de existir y poder compartir con ella este logro tan importante en mi vida.

A mis hermanos: Cuca, Blanca, Bernardo, Victor y a mi cuñado Memo por la enorme paciencia que han tenido conmigo y el apoyo incondicional que de ellos he recibido en todo momento, y que me hace reafirmar aun más el cariño y respeto que siento hacia ellos.

Al Dr. Moreno le agradezco profundamente el que me halla permitido realizar mi Tesis en su laboratorio, y por lo bien que me hace sentir al ser integrante de su grupo de investigación y así continuar en esta maravillosa y continua comprensión de la vida.

A Laura por la amistad que me ha brindado y el aprendizaje profesional que he tenido ha su lado, lo cual ha cambiado enormemente mi manera de ver la vida y por lo cual le estaré eternamente agradecida.

Esta tesis esta dedicada también a mis amigos y compañeros del laboratorio: Rosita, Abigail, Genaro, Judith, Chucho, Jibran, Silvia, Hugo, Alma, Paty Valadez, Saúl y Rebeca a quién les agradezco su confianza y comprensión para la realización de esta Tesis.

A la Dra. Ana María Rosales y Marcela por su actitud siempre positiva.

A mis compañeros de la UAM-Xochimilco: Alejandro, Juanita, Dora, Rubén, Gerardo y Hector por brindarme su amistad.

# ÍNDICE

página

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
-----------------------------	---

## **CAPÍTULO 1**

RESÚMEN.....	2
--------------	---

## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

2.1. Respuesta inmune.....	4
2.2. Inmunidad humoral.....	5
2.3. Formación de centros germinales.....	5
2.4. Activación de linfocitos B por linfocitos T CD4.....	6
2.5. La interacción CD40-CD40L.....	7
2.6. Efecto de la interacción CD40-CD40L en la inmunidad humoral:	
2.6.1. Proliferación.....	8
2.6.2. Producción de anticuerpos y cambio de isotipo.....	9
2.6.3. Formación de centros germinales y generación de células de memoria.....	10
2.6.4. Prevención de apoptosis.....	10
2.7. CD40-CD40L en la enfermedad.....	11
2.7.1. Autoinmunidad.....	11
2.7.2. Lupus Eritematoso Sistémico.....	14

## **CAPÍTULO 3**

JUSTIFICACIÓN.....	18
--------------------	----

## **CAPÍTULO 4**

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
---------------------------------	----

<b>CAPÍTULO 5</b>	
HIPÓTESIS.....	19
<b>CAPÍTULO 6</b>	
OBJETIVOS GENERALES.....	19
<b>CAPÍTULO 7</b>	
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
<b>CAPÍTULO 8</b>	
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
8.1. Pacientes.....	26
8.2. Expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES.....	27
8.3. Expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES bajo diferentes estímulos.....	33
<b>CAPÍTULO 9</b>	
DISCUSIÓN.....	43
<b>CAPÍTULO 10</b>	
CONCLUSIONES.....	47
<b>CAPÍTULO 11</b>	
BIBLIOGRAFÍA.....	50
APÉNDICES.....	48

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AET</b>	Bromuro de 2-amino etilisotiouranio
<b>BCR</b>	Receptor de antígeno para linfocitos B
<b>CMN</b>	Células mononucleares
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígenos
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>IP</b>	Yoduro de propidio
<b>LES</b>	Lupus Eritematoso Sistémico
<b>LO-ME</b>	Metil-ester de leucina
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>PMA</b>	4-forbol-12-miristato-13-acetato
<b>RIL-2</b>	Receptor de IL-2
<b>TCR</b>	Receptor de antígenos para linfocitos T

## 1. RESÚMEN

La respuesta inmune humoral timodependiente requiere la participación de linfocitos T para la activación de linfocitos B. La primera señal de activación del linfocito B depende de la unión del antígeno al receptor para antígeno del linfocito B (BCR), además, de señales coestimuladoras y mediadores solubles aportados por el linfocito T. De las señales coestimuladoras más estudiadas involucradas en la activación del linfocito B esta la señal dada por la interacción de la molécula CD40 en el linfocito B con su ligando (CD40L) en el linfocito T, la cual se ha visto que es necesaria en la producción de anticuerpos, cambio de isotipo y generación de linfocitos B de memoria. En las enfermedades autoinmunes mediadas por autoanticuerpos, como en la respuesta inmune normal, se requiere la participación de linfocitos T antígeno específicos para la activación de linfocitos B autorreactivos, donde las mismas señales coestimuladoras parecen ser requeridas. El lupus eritematoso sistémico (LES) es el prototipo de enfermedad autoinmune sistémica mediada por autoanticuerpos, los cuales están dirigidos principalmente contra DNA, histonas, ribonucleoproteínas y otros componentes nucleares y citoplásmicos. Su etiología es desconocida, aunque parecen participar algunos defectos en el sistema inmune, además de factores ambientales, hormonales y genéticos.

Los autoanticuerpos anti-DNA patogénicos en LES y sus modelos murinos son de clase IgG. La producción de anticuerpos IgG por los linfocitos B depende de la interacción CD40-CD40L. Por lo tanto, el estudio de esta interacción es importante para entender la patogenia de esta enfermedad.

La participación de la interacción CD40-CD40L en el LES ha sido estudiada sobre todo en modelos animales, en los que el tratamiento con anti-CD40L retarda la enfermedad. La interacción CD40-CD40L podría contribuir a la patogenia del LES a través de interacciones antígeno específicas entre linfocitos B y linfocitos T autorreactivos, aunque algunos estudios sugieren una participación inespecífica de la interacción CD40-CD40L en linfocitos de pacientes con LES.

Nuestro trabajo consistió en analizar la expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES activo e inactivo y estudiar la cinética de expresión de dicha molécula bajo diferentes estímulos.

Los resultados demostraron que no hay expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES y que la



cinética de expresión de CD40L en los linfocitos de estos pacientes es normal. Por lo tanto estos resultados indican que no hay activación policlonal en los linfocitos de pacientes con LES y sugieren que la participación de la interacción CD40-CD40L puede ser a nivel de linfocitos T y B antígeno específicos, al igual que en una respuesta inmune normal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Respuesta inmune

El sistema inmune combate agentes extraños mediante dos mecanismos esenciales: la inmunidad natural o innata y la inmunidad específica o adaptativa. Esta última se caracteriza por ser específica, inducible y con memoria que permite, ante un segundo contacto, eliminar más rápida y eficazmente al patógeno que indujo la respuesta.

Las células responsables de la inmunidad específica son los linfocitos, los cuales pueden ser linfocitos T o linfocitos B que derivan de células progenitoras en la médula ósea. Los linfocitos T se diferencian en el timo y los linfocitos B en la médula ósea, que son los órganos linfoides primarios. En ellos, los linfocitos adquieren su repertorio de receptores antígeno específicos. Los órganos linfoides secundarios que incluyen el bazo, ganglios linfáticos y tejido linfóide asociado a mucosas, proveen el ambiente donde los linfocitos interactúan entre sí y con los antígenos extraños<sup>1,2</sup>.

Los linfocitos B reconocen antígenos de manera específica a través de una molécula de inmunoglobulina de superficie que es su receptor para el antígeno (BCR). Los antígenos reconocidos por los linfocitos B incluyen proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, además de pequeñas moléculas. Estos son habitualmente reconocidos en su forma nativa<sup>1,3</sup>.

Por otro lado, los linfocitos T reconocen antígenos a través de un receptor específico de superficie (TCR). A diferencia del receptor de los linfocitos B, el TCR no reconoce antígenos nativos, sino proteínas que deben ser procesadas intracelularmente a péptidos capaces de asociarse a moléculas propias del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)<sup>1,4</sup>.

Los linfocitos T pueden ser CD4+ o CD8+. Los primeros reconocen péptidos unidos a moléculas MHC clase II, mientras que los segundos reconocen péptidos unidos a moléculas MHC clase I. Los linfocitos T CD4+, dependiendo del tipo de mediadores solubles que secretan, se dividen a su vez en linfocitos Th1 o linfocitos Th2. Los linfocitos CD4+, Th1 y Th2 son los linfocitos T inductores, mientras que los linfocitos T

CD8+ son en su mayoría citotóxicos<sup>1</sup>.

## **2.2. Inmunidad humoral**

La inmunidad humoral, mediada por linfocitos B a través de la secreción de anticuerpos, es importante para la defensa contra microorganismos extracelulares, para eliminar toxinas solubles y en las fases de diseminación de infecciones intracelulares. La inmunidad humoral requiere activación de linfocitos B y puede ser timoindependiente o timodependiente (cuando participan en ella linfocitos T inductores). La respuesta humoral timodependiente es la respuesta habitual contra antígenos proteicos o antígenos, que sin ser proteicos, se encuentran unidos a una proteína. Ocurre en los órganos linfoides secundarios; en especial en los límites entre la zona paracortical, rica en linfocitos T, y los folículos linfoides, poblados por linfocitos B<sup>5</sup>.

La respuesta timodependiente se divide en primaria y secundaria. La respuesta primaria ocurre durante el primer contacto con el antígeno, cuando los linfocitos B se unen a éste a través de su BCR, lo internalizan, lo procesan y lo presentan en forma de péptidos asociados a moléculas MHC clase II a linfocitos T inductores específicos. Este contacto implica, además, la interacción de moléculas de adhesión, señales coestimuladoras y liberación de mediadores solubles por el linfocito T, lo cual resulta en activación de los linfocitos B que proliferan se diferencian a células plasmáticas productoras, inicialmente, de anticuerpos IgM, en su mayoría, de baja afinidad. Otros linfocitos B activados se diferencian a células de memoria que dan lugar a los centros germinales dentro de los folículos linfoides y que eventualmente son la base de la respuesta secundaria<sup>6</sup>.

## **2.3. Formación de Centros Germinales**

En los centros germinales hay gran proliferación de linfocitos B activados, durante la cual, el BCR se diversifica nuevamente por un proceso conocido como hipermutación somática, que introduce mutaciones puntuales a todo lo largo de los genes de las regiones

variables de las cadenas pesada y ligera ( $V_H$  y  $V_L$ ) de inmunoglobulina. Después de varios ciclos de división (y por tanto, de hipermutación somática) son seleccionados los linfocitos con un BCR de mayor afinidad por el antígeno. Esto se conoce como maduración de la afinidad.

Además de la maduración de afinidad, en los centros germinales ocurre el cambio de isotipo de inmunoglobulina, que hace que los genes de cadena rearreglados en VDJ recombinen sus segmentos de región constante, dando lugar a anticuerpos de diferentes isotipos que tienen la misma especificidad para el antígeno pero diferente función biológica<sup>5-7</sup>.

Así, durante la respuesta secundaria, en los centros germinales muchos linfocitos B se diferencian a células plasmáticas que producen anticuerpos con mayor afinidad, mientras que otros siguen generando linfocitos B de memoria. La respuesta secundaria, actúa de manera más rápida y eficiente ante un segundo contacto con el antígeno.

Sin embargo, la mutación somática puede modificar la especificidad de los linfocitos B, inclusive hacia antígenos propios (autoantígenos). De ahí que en la maduración de afinidad es nuevamente importante la presencia de mecanismos de selección para que, sólo los linfocitos B con alta afinidad para el antígeno sobrevivan y los que pierdan la capacidad de reconocer al antígeno o adquieran especificidad por antígenos propios sean eliminados. Este proceso de selección está dirigido por las células dendríticas foliculares y linfocitos T inductores activados<sup>7-9</sup>.

Hay modelos experimentales que sugieren que los linfocitos B específicos hacia antígenos propios, generados en esta etapa, son eliminados en centros germinales por el mismo autoantígeno en circulación, por un mecanismo del cual hablaremos más adelante<sup>8,9</sup>.

#### **2.4. Activación de linfocitos B por linfocitos T CD4**

Como ya se ha comentado, en la respuesta inmune humoral hacia antígenos timodependientes el linfocito B específico es activado por un linfocito T inductor específico casi siempre contra el mismo antígeno, aunque contra distintos determinantes antigénicos. Para tal

evento se necesita que el linfocito T sea también activado, lo cual se logra a través del contacto con una célula presentadora de antígenos (CPA), que puede ser el mismo linfocito B. Para ser una CPA eficiente, el linfocito B necesita ser estimulado adicionalmente, por ejemplo con lipopolisacárido bacteriano, para que exprese mayor cantidad de moléculas MHC clase II y moléculas coestimuladoras<sup>6</sup>.

El primer evento en la activación del linfocito B es el contacto directo entre el linfocito T y el B a través de moléculas de adhesión como CD54 en el linfocito B con su ligando CD11a/CD18 en el linfocito T<sup>10,11</sup>. Antes de esto, la activación inicial del linfocito B, depende de la unión del antígeno al BCR.

El antígeno unido al BCR es endocitado, procesado en la vía endocítica a péptidos que son presentados por moléculas MHC clase II en la superficie del linfocito B. El linfocito T reconoce péptidos antigénicos a través del TCR. Cuando el linfocito B es una eficiente CPA, la interacción TCR-péptido-MHC y las interacciones de contacto, proporcionan señales de activación al linfocito T, induciendo en este la expresión de CD40L. La interacción CD40L-CD40 induce en el linfocito B la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), las cuales interactúan con CD28 en el linfocito T, lo cual lleva a éste finalmente a la secreción de citocinas como IL-2, IL-4, IL-5, etc<sup>5,12,13</sup>.

La interacción de CD40L en el linfocito T con CD40 en el linfocito B, proporciona, a éste, la señal necesaria para el cambio de isotipo, el cual finalmente depende de las distintas citocinas presentes en el sitio en que ocurre la activación del linfocito B<sup>14</sup>. La interacción CD40-CD40L es también fundamental en la generación de linfocitos B de memoria.

## **2.5. La interacción CD40-CD40L**

CD40L (también conocido como gp39, TBAM, TRAP, 5c8, CD154) es una glucoproteína de membrana tipo II de 33 kDa, de expresión inducible y transitoria, principalmente en la superficie de linfocitos T CD4+ activados<sup>15</sup>, aunque también es expresada en bajo porcentaje por linfocitos B, linfocitos CD8+, basófilos y eosinófilos activados<sup>16-19</sup>. CD40L pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF).

El receptor para CD40L, CD40, es una glucoproteína de membrana tipo I de 40 a 50 kDa, perteneciente a la familia del receptor de TNF, expresada constitutivamente por CPA profesionales que son las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, además de las células dendríticas foliculares de los centros germinales<sup>20,21</sup>. También el epitelio tímico, algunas células endoteliales y muchas células parenquimatosas y no parenquimatosas de riñón expresan CD40<sup>22-24</sup>.

## **2.6. Efecto de la interacción CD40-CD40L en la inmunidad humoral**

Se han realizado múltiples estudios acerca de los efectos de la interacción CD40-CD40L en el linfocito B. Algunos eventos incluyen: adhesión homotípica, proliferación, cambio de isotipo y secreción de anticuerpos. Se ha observado además que esta interacción induce un incremento en la expresión de CD23, MHC clase II, RIL-2 $\alpha$  (CD25) y CD80/CD86. El entrecruzamiento de CD40 induce también en el linfocito B la producción de IL-6 e IL-10<sup>25</sup>.

Los efectos funcionales más importantes del entrecruzamiento de CD40 en el linfocito B son: proliferación, producción de anticuerpos, cambio de isotipo, formación de centros germinales, generación de células de memoria y prevención de apoptosis de centrocitos en centros germinales.

### **2.6.1. Proliferación**

La activación de linfocitos B a través de CD40 se estudia con anticuerpos monoclonales antiCD40 solubles o inmovilizados o con CD40L soluble asociada a membrana. En estos modelos, el grado de activación del linfocito B depende, en gran medida, de las condiciones en que se lleva a cabo el entrecruzamiento de CD40.

En su forma soluble, por ejemplo, algunos anticuerpos anti-CD40 inducen una proliferación mínima de los linfocitos B<sup>26</sup>. El mismo efecto se ha visto con la forma soluble de CD40L (trimero)<sup>27</sup>. La adición de IL-4 incrementa la respuesta de los linfocitos B a la estimulación con ambos tipos de estímulo<sup>26</sup>.

Cuando se utilizan ligandos inmovilizados en células, como células L transfectadas con CD40L humano, hay una proliferación intensa y sostenida de linfocitos B. Cuando se adiciona IL-4 a los sistemas de ligandos inmovilizados la población de linfocitos B se expande más de 1000 veces<sup>28,29</sup>. Otras citocinas como la IL-13, IL-1, INF $\gamma$  y la IL-10 también tienen efectos sinérgicos o aditivos en la proliferación de linfocitos B en respuestas a CD40L inmovilizado<sup>17,30</sup>.

### **2.6.2. Producción de anticuerpos y cambio de isotipo**

La interacción CD40-CD40L tiene un papel importante en la producción de anticuerpos y en el cambio de isotipo, donde la participación simultánea de una ó más citocinas resulta en cambio de isotipo a las diferentes subclases de inmunoglobulinas.

Los isotipos murinos que se sabe son inducibles por citocinas son IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgE e IgA. En el humano, los isotipos coestimulados por citocinas son IgG1, IgG3, IgG4, IgE e IgA.

La IL-4 induce en linfocitos B murinos estimulados con anti-CD40 inmovilizado un ligero incremento en la producción de IgM e IgG y secreción de grandes cantidades de IgE<sup>31</sup>. Por otra parte, los linfocitos B murinos y humanos estimulados con células transfectadas con CD40L también secretan IgE en respuesta a IL-4<sup>29</sup>. Lo anterior confirma que la interacción CD40-CD40L junto con la IL-4 participa de manera importante en el cambio de isotipo a IgE. La IL-13 tiene efectos similares a la IL-4<sup>17</sup>.

Por otra parte la IL-5 participa de manera sinérgica con la IL-4 para la producción de IgM, IgE, IgG1 e IgG3 por linfocitos B murinos activados por CD40<sup>32</sup>.

La IL-10, en linfocitos B humanos de amígdalas activados con anti-CD40, induce la secreción de IgG1, IgG2 e IgG3<sup>33</sup>. La IL-10 en estos sistemas también produce bajos niveles de IgA1, pero cuando se adiciona TGF $\beta$  se producen grandes cantidades de IgA1 e IgA2 y se inhibe la producción de IgM e IgG<sup>34</sup>.

### **2.6.3. Formación de centros germinales y generación de células de memoria**

Las primeras evidencias al respecto surgieron de experimentos *in vitro* en los que los linfocitos B de centros germinales activados a través de CD40 en presencia de IL-2 e IL-10, adquieren un fenotipo de linfocitos B de memoria, mientras que el bloqueo de la interacción CD40-CD40L dirige la diferenciación de los linfocitos B de centros germinales a células plasmáticas<sup>35</sup>.

Una de las evidencias más importantes proviene de estudios en pacientes con síndrome hiper-IgM, con defectos en el gen de CD40L. Estos pacientes tienen una ausencia de centros germinales en órganos linfoides secundarios e incapacidad para montar una respuesta secundaria hacia antígenos timodependientes<sup>36,37</sup>. Con la identificación del síndrome hiper-IgM, se han creado varios modelos animales con el fin de semejar la enfermedad y estudiar con mayor detalle los efectos de la interacción CD40-CD40L.

En experimentos de bloqueo *in vivo* se ha encontrado, que ratones tratados con anti-CD40L no desarrollan centros germinales. Los experimentos de transferencia adoptiva en estos ratones demuestran que la generación de linfocitos B de memoria antígeno específicos está también inhibida<sup>38</sup>.

De manera similar, los ratones deficientes en el gen para CD40 y CD40L, con un fenotipo parecido a los pacientes con síndrome hiper-IgM, no desarrollan centros germinales ni linfocitos B de memoria<sup>39,40</sup>.

### **2.6.4. Prevención de apoptosis**

Se sabe que el entrecruzamiento del BCR en linfocitos B inmaduros causa apoptosis y en linfocitos B maduros proliferación. Algunos trabajos demuestran que un entrecruzamiento muy extenso o muy limitado del BCR induce apoptosis en linfocitos B maduros y que la estimulación a través de CD40 (anticuerpos anti-CD40 ó linfocitos T activados) previene completamente la apoptosis en ambas condiciones<sup>41,42</sup>.

*In vitro*, los anticuerpos anti-CD40 ó anti-IgM previenen la apoptosis



de los linfocitos B de centros germinales<sup>43</sup>. Sin embargo, los mismos estímulos no son suficientes para prevenir la apoptosis de linfocitos B de sangre periférica<sup>44</sup>, a menos que sean estimulados con anti-CD40 e IL-4, lo cual disminuye la apoptosis<sup>45</sup>. Además, la apoptosis de una línea celular de linfoma B inducida por anticuerpos anti-IgM puede ser prevenida con anti-CD40<sup>46</sup>.

En conjunto, lo anterior explica en gran parte como los linfocitos B en los centros germinales, son rescatados de la apoptosis durante la maduración de la afinidad: aquellos linfocitos B que reciben la señal antígeno específica a través de su inmunoglobulina de superficie y además, reciben la señal de CD40 por un linfocito T inductor antígeno específico activado, son rescatados de apoptosis, mientras que aquellos que solo reciben una de las dos señales mueren por apoptosis<sup>7</sup>.

## **2.7. CD40-CD40L en enfermedad**

Dada su importante función, ha sido de gran interés de muchos grupos descifrar el papel de CD40L en diversas enfermedades, como es el caso de algunas inmunodeficiencias, en infecciones virales y en autoinmunidad<sup>36,37,47,48</sup>. En autoinmunidad, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la enfermedad injerto contra huésped y la esclerosis múltiple son algunas de las enfermedades donde la participación de CD40L ha sido estudiada, como veremos más adelante.

### **2.7.1. Autoinmunidad**

#### **Tolerancia y Autoinmunidad**

La capacidad del sistema inmune de no responder en contra de lo propio, se conoce como tolerancia inmunológica. La tolerancia puede ser mediada por varios mecanismos, en especial delección clonal y anergia clonal.

#### **a. Delección clonal**

Los linfocitos T durante su maduración en el timo, sufren un proceso de selección negativa, principalmente en la médula tímica, durante el cual, los timocitos con TCR con gran afinidad por péptidos propios

unidos a las moléculas propias del MHC son eliminados mediante un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. Este proceso se conoce como delección clonal<sup>2,6</sup>.

De manera similar, los linfocitos B durante su maduración en médula ósea, al reconocer antígenos propios multivalentes y/o en altas concentraciones, como por ejemplo proteínas en la superficie celular, son eliminados predominantemente por delección clonal<sup>1,49</sup>.

Sin embargo, muchos linfocitos T y B autorreactivos escapan de la delección clonal en los órganos linfoides primarios, ya sea porque los autoantígenos reconocidos por ellos no se encuentran en timo o médula ósea, o bien, están en muy bajas concentraciones. Estos linfocitos maduran en periferia y en ellos la tolerancia inmunológica es mediada por mecanismos diferentes.

### **b. Anergia clonal**

Tanto en linfocitos B, como T, la anergia clonal se ha descrito como el resultado de una respuesta a un antígeno en ausencia de segundas señales (coestimuladoras). Los linfocitos T se hacen anérgicos al reconocer antígenos propios en células presentadoras de antígeno (CPA) no profesionales, que carecen de moléculas coestimuladoras (B7.1 y B7.2), necesarias para activarlos<sup>6,50</sup>. Los linfocitos B son anérgizados al reconocer antígenos a través de su inmunoglobulina de superficie en ausencia de su linfocito T antígeno específico, el cual ha sido eliminado en el timo<sup>6,50</sup>. En ambos casos esto ocurre más frecuentemente con células autorreactivas.

### **c. Ignorancia clonal**

La ignorancia clonal es el mecanismo más frágil de tolerancia inmunológica, de hecho, no puede ser considerado como tolerancia, sino como una falta de respuesta simplemente por no haberse identificado la presencia del antígeno. Los linfocitos ignorantes no sufren anergia clonal ni delección clonal, sino que permanecen ignorantes de la existencia del antígeno. Los linfocitos ignorantes existen en todos los individuos sanos sin causar daño alguno, aunque la presencia simultánea de linfocitos T y B ignorantes dirigidos contra

el mismo antígeno es excepcional.

La mayoría de los linfocitos B ignorantes reconocen antígenos intracelulares como proteínas de citoesqueleto, nucleares, de estrés, etc. Cuando llegan a estar presentes, los autoanticuerpos producidos por los linfocitos B ignorantes son de baja afinidad (IgM) y en bajas cantidades, por lo que habitualmente no son patogénicos<sup>7,50</sup>.

Los linfocitos T ignorantes habitualmente reconocen proteínas diversas en tejidos no linfoides, que no necesariamente están secuestradas<sup>7,50</sup>.

La ruptura de cualquiera de los mecanismos de tolerancia podría resultar en enfermedad autoinmune. No obstante, para que surja una enfermedad autoinmune por autoanticuerpos debe haber activación de linfocitos T y B autorreactivos. Se han descrito muchos posibles mecanismos patogénicos que pueden contribuir al desarrollo de una enfermedad autoinmune, y que no son necesariamente excluyentes: Por ejemplo, los linfocitos T y B autorreactivos podrían activarse por reactividad cruzada con antígenos extraños (mimetismo molecular), activación de linfocitos T por presentación de determinantes no expuestos (epítomos crípticos), activación de linfocitos T por superantígenos, factores genéticos, fallas en la regulación inmune, etc<sup>6,7</sup>.

En las enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos, la producción de autoanticuerpos, como en la respuesta inmune normal, requiere de la participación de linfocitos T antígeno específicos para la activación de los linfocitos B autorreactivos. Aparentemente, las mismas señales coestimuladoras son requeridas para la proliferación, producción de autoanticuerpos, cambio de isotipo y linfocitos B de memoria. Como se mencionó, la señal coestimuladora mejor caracterizada y que participa en todos estos mecanismos, es la señal mediada por la interacción CD40-CD40L.

De acuerdo con lo anterior, se ha estudiado la participación de CD40L en enfermedades autoinmunes. En algunos modelos animales de enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad injerto contra huésped y esclerosis múltiple, el tratamiento con anti-CD40L tiene un efecto benéfico, retardando el daño tisular mediado por el proceso autoinmune.

### 2.7.2. Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

El LES, que es la enfermedad de interés en este estudio, es el prototipo de enfermedad autoinmune sistémica mediada por anticuerpos. Aunque las causas del LES son desconocidas, muchas evidencias señalan que algunos defectos en el sistema inmune tienen un papel principal, además de factores genéticos, hormonales y ambientales.

El LES es más frecuente en mujeres jóvenes, especialmente entre los 15 y los 45 años de edad principalmente, lo cual sugiere una fuerte influencia de los estrógenos en el LES. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variables y pueden ser leves, restringidas a la piel y las articulaciones; hasta manifestaciones graves multisistémicas, cuyo sitio principal de daño es el riñón, además de otros órganos que incluyen el sistema nervioso central, pulmones, etc<sup>6</sup>. Esta variabilidad en la enfermedad complica su diagnóstico y señala la necesidad de individualizar la evaluación y recomendaciones para cada paciente. Por tal razón el Colegio Americano de Reumatología (ACR) estableció en 1982 criterios de clasificación clínicos y de laboratorio que han ayudado enormemente en la identificación de pacientes con LES<sup>63</sup> (ver apéndice 1).

Además de los criterios de clasificación para un diagnóstico acertado del LES se han desarrollado y validado diversos índices clínicos para medir la actividad de la enfermedad; uno de ellos, y el más utilizado, es el índice de actividad de la enfermedad para LES "SLEDAI" (ver apéndice 2)<sup>64</sup>. La actividad de la enfermedad es un reflejo del tipo y la severidad del órgano afectado en algún momento de la enfermedad, y es de suma importancia para un tratamiento adecuado del LES.

Los pacientes con LES tienen múltiples autoanticuerpos. Los más característicos son los anti DNA, pero también los hay contra componentes nucleares (histonas, ribonucleoproteínas), fosfolípidos, neuronas, eritrocitos y plaquetas. Los anticuerpos anti DNA del isotipo IgG, que unen DNA de doble cadena, tienen un papel importante en el desarrollo de glomerulonefritis por complejos inmunes, los cuales se depositan en las paredes de los vasos glomerulares renales, donde activan al sistema del complemento. Este proceso induce inflamación local y daño tisular que libera más antígeno de las células dañadas y

exacerba el daño tisular<sup>6</sup>.

### **a. Modelos murinos**

Diversas cepas de ratón como la NZB/NZWF<sub>1</sub> (BWF<sub>1</sub>), NZB/SWRF<sub>1</sub> (SNF<sub>1</sub>), MRL-*lpr/lpr* (deficiente en el gen de Fas) y BxSB (en machos) desarrollan espontáneamente una enfermedad parecida al LES humano. En algunos de estos ratones se han aislado clones de linfocitos T inductores autorreactivos que inducen la producción de autoanticuerpos anti-DNA patogénicos por linfocitos B<sup>52</sup>.

En el modelo SNF<sub>1</sub>, algunas clonas representativas inducen rápidamente nefritis lúpica al ser transferidas a ratones jóvenes. La mayoría de estas clonas responden a antígenos de nucleosomas (complejos de DNA con histonas)<sup>53</sup>. Los autoanticuerpos anti-DNA inducidos por estas clonas tienen numerosos residuos básicos en las regiones V<sub>H</sub>, generados por mutación somática, y son de clase IgG que fijan complemento<sup>54</sup>.

Lo anterior, apoya la hipótesis de que la producción de autoanticuerpos patogénicos anti-DNA en LES se debe a interacciones cognatas entre poblaciones selectas de linfocitos T y B autorreactivos.

La importancia de la interacción entre linfocitos T inductores y linfocitos B autoreactivos en el desarrollo de lupus, ha sido estudiada a nivel de señales coestimuladoras, incluyendo la interacción CD40-CD40L.

En ratones SNF<sub>1</sub>, que desarrollan nefritis lúpica alrededor de los 6 meses de edad, se ha observado que el tratamiento temprano con anti-CD40L, retrasa más allá de los nueve meses el inicio de la nefritis lúpica severa hasta en un 60%. En el suero, los niveles de autoanticuerpos patogénicos disminuyen considerablemente. El efecto benéfico de la terapia con anti-CD40L en estos ratones, es probablemente por el bloqueo de la expansión de linfocitos B de memoria autorreactivos, comprometidos con la producción de autoanticuerpos patogénicos<sup>55</sup>.

En ratones BWF<sub>1</sub>, la terapia con anti-CD40L también tiene efectos benéficos, con disminución de la producción de autoanticuerpos anti-

DNA, reducción del daño renal y supervivencia prolongada<sup>56</sup>. De manera similar, la disminución de la producción de autoanticuerpos patogénicos anti-DNA y anti-IgG (factor reumatoide) en ratones MRL-*lpr/lpr* deficientes en CD40L, es dependiente de la interacción CD40-CD40L<sup>57</sup>.

En estudios de linfocitos de ratones predispuestos a nefritis lúpica se encontró que los linfocitos T de bazo de ratones SNF<sub>1</sub> de un mes de edad expresan CD40L, lo que no ocurre en un control SWR. La estimulación con anti-CD3 incrementa la proporción de linfocitos T que expresan CD40L, siendo nuevamente mayor la expresión en el ratón SNF<sub>1</sub> que el control<sup>55</sup>.

Interesantemente, en ratones machos BxSB (en esta cepa el LES se presenta en machos y está ligado al cromosoma Y) una subpoblación de linfocitos B de bazo (linfocitos grandes) expresa CD40L, tanto en ausencia como en presencia de lipopolisacárido (activador de linfocitos B) a las 24 hs de cultivo. La expresión de CD40L es funcional, sugiriendo que la autoinmunidad en estos ratones podría deberse a una ruptura en los mecanismos que regulan la expresión de esta molécula en los linfocitos B<sup>58</sup>.

## **b. Estudios en humanos**

En pacientes con LES activo, pero no en sujetos normales ni en pacientes en remisión, se han encontrado también clones de linfocitos inductores autorreactivos, las cuales son capaces de inducir la producción de autoanticuerpos patogénicos anti-DNA cuando son cocultivadas con linfocitos B autólogos<sup>59</sup>. Estas clones autorreactivas, como en los ratones, también responden a nucleosomas<sup>60</sup>. Los autoanticuerpos patogénicos producidos por pacientes con LES, con evidencias de mutación somática y cambio de isotipo (evidencias indirectas de la participación del antígeno y los linfocitos T, respectivamente) tienen un papel importante en el desarrollo de la glomerulonefritis por complejos inmunes<sup>51</sup>.

Los estudios mencionados, al igual que los estudios en ratones, sugieren una cooperación antígeno específica entre linfocitos B y linfocitos T autorreactivos en la producción de autoanticuerpos patogénicos anti-DNA. Sin embargo algunos autores han sugerido que

el LES podría deberse a una activación policlonal de linfocitos B autorreactivos (sobre todo en etapas tempranas), independiente del antígeno y de linfocitos T inductores.

Recientemente el grupo de Syamal Datta encontró, que en pacientes con LES activo hay expresión de CD40L por linfocitos T CD4+ de sangre periférica, sin previa estimulación exógena. En estos pacientes CD40L es expresado también por linfocitos T CD8+ y, sorpresivamente por linfocitos B, comparado con controles sanos y pacientes en remisión. Además, al estimular linfocitos de los pacientes en remisión y controles sanos, con dosis subóptimas de mitógenos, la expresión de CD40L por linfocitos T y B de pacientes en remisión, es marcadamente mayor que en los controles normales, indicando defectos intrínsecos en la regulación de CD40L en los linfocitos de estos pacientes<sup>61</sup>.

A diferencia de estos resultados el grupo de Mary Crow no encontró expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES activo. Sin embargo la cinética de expresión de CD40L bajo el estímulo de ionomicina y PMA mostró resultados diferentes en controles y en pacientes: En controles hubo una máxima expresión de CD40L a las 6 hrs con una disminución gradual a niveles basales a las 48 hs de cultivo. Mientras que en pacientes, a las 24 y 48 hs todavía había una elevada expresión de CD40L, lo que sugiere que en los pacientes con LES hay una regulación anormal de la expresión de CD40L<sup>62</sup>.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune mediada por autoanticuerpos en la que los mecanismos responsables de la activación de linfocitos B y el cambio de isotipo que resulta en autoanticuerpos patogénicos, IgG, son desconocidos. La interacción CD40-CD40L, que es esencial para el cambio de isotipo en condiciones normales, parece tener un papel importante en la patogenia de modelos animales de LES. Los mecanismos mediante los que la interacción CD40-CD40L contribuye a la patogenia de la enfermedad son desconocidos, pero se han propuesto varias posibilidades, una de ellas (y la más factible) es que la participación de la interacción CD40-CD40L es entre linfocitos T y B autoinmunes antígeno específicos, aunque otra posibilidad sería una estimulación inespecífica de linfocitos B a través de la molécula CD40 con su ligando CD40L, resultando en producción indiscriminada de anticuerpos.

Apoyando la primera posibilidad, en algunos pacientes y en modelos murinos de LES, se ha encontrado que la producción de autoanticuerpos es secundaria a interacciones entre poblaciones de linfocitos T y B autoinmunes y que el inmunógeno principal son antígenos de los nucleosomas.

La segunda posibilidad es apoyada por estudios en modelos animales, en los cuales se encontró expresión de CD40L en la membrana de linfocitos T y B de bazo. Además en estudios más recientes, un grupo de investigadores, a diferencia de otro, encontró expresión de CD40L en la membrana de linfocitos T y B de sangre periférica en pacientes con LES. Entonces, este hallazgo requiere de ser comprobado. Dado que el LES en humanos es una enfermedad heterogénea y que de hecho podría considerarse un síndrome, es posible que ambas posibilidades sean correctas en casos individuales de la enfermedad.



#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De acuerdo a lo anterior nos planteamos las siguientes preguntas:

1. ¿Existe expresión generalizada de CD40L en la superficie de linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES activo?
2. ¿Existen diferencias en la cinética de expresión inducida de CD40L entre pacientes con LES activo e individuos sanos?

#### **5. HIPÓTESIS**

1. En algunos pacientes con LES, los linfocitos de sangre periférica expresan CD40L en la membrana en forma generalizada.  
En la mayoría de los pacientes con LES, los linfocitos de sangre periférica no expresan CD40L en la membrana en forma generalizada.
2. La cinética de expresión inducida de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES podría ser diferente o no con respecto a la de individuos sanos.

#### **6. OBJETIVOS GENERALES**

1. Analizar la expresión de CD40L en la superficie de linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES activo.
2. Comparar la cinética de expresión de CD40L, bajo diferentes estímulos, entre pacientes con LES con diferentes grados de actividad e individuos sanos.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Pacientes**

Los pacientes que se incluyeron en el presente estudio cumplieron con los siguientes criterios:

- Diagnostico de LES hecho por un reumatólogo, de acuerdo a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología<sup>63</sup> (ACR, apéndice 1).
- Que tuvieran o no actividad clínica de acuerdo con el índice de actividad para LES<sup>64</sup> (SLEDAI, apéndice 2).
- Sin tratamiento con esteroides o con una dosis inferior a 30 mg/día de prednisona.

Se excluyeron pacientes con las siguientes características:

- LES inducido por drogas
- Infección al momento de la evaluación
- Tratamiento con ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina o algún otro inmunosupresor en el último mes

### **Controles**

Los controles fueron individuos de ambos sexos, aparentemente sanos, sin familiares con LES y sin ningún tipo de infección en el momento de la toma de muestra.

## Reactivos y soluciones

Las soluciones empleadas fueron; amortiguador de sales de fosfato (PBS): NaCl 15 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM pH 7.4 utilizando agua bidestilada y filtrándolo por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  cuando se requería. Buffer de lisis:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15 M,  $\text{KHCO}_3$  1mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1mM pH 7.4. Medio de cultivo: RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 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). Las soluciones de bromuro de 2-aminoetilisotiouurano (AET, Sigma Chemicals) y metil-éster de leucina (LO-ME) se prepararon en el momento de su uso. Para activar a los linfocitos se usó el éster de forbol, 4-forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma) y el ionoforo de calcio, Ionomicina (Boehringer Mannheim), las soluciones de estos activadores se prepararon también en el momento de su uso. La estreptoavidina marcada con ficoeritrina utilizada en los análisis para citometría de flujo fue obtenida de Jackson ImmunoResearch.

## Anticuerpos

El anticuerpo para la molécula CD40L humana (24-31) fue donado por el Dr. Randy Noelle de la Universidad de Dartmouth. Los hibridomas OKT3, G28-5 y 7G7.B6 productores de los anticuerpos anti-CD3, anti-CD40 y anti-RIL-2 respectivamente (marcadores para linfocitos T CD3+, linfocitos B y para la cadena  $\alpha$  del RIL-2 respectivamente) fueron obtenidos de la American Type Culture Collection (ATCC). Los anticuerpos producidos por estos hibridomas fueron purificados, por cromatografía de afinidad, de sobrenadantes de cultivo y posteriormente biotinilados o fluoresceinados por métodos estándares. Los anticuerpos anti-CD4 FITC, anti-CD8 FITC, anti-CD19 FITC y anti-CD56 PE (marcadores para linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B y células NK respectivamente) fueron obtenidos de Dako. El anticuerpo anti-CD3 (64.1) utilizado para activar a los linfocitos T fue un obsequio del Dr. Peter Lipsky.

### **Obtención de células mononucleares de sangre periférica**

Se obtuvieron, por venopunción, 20 ml de sangre en un tubo con anticoagulante, la cual se diluyó 1:2 en solución salina isotónica. Se colocaron 20 ml de sangre diluida en tubos de 50 ml sobre 10 ml de Ficoll-Hypaque (sigma) y se centrifugó a 1500 rpm, a temperatura ambiente, por 45 min. Con una pipeta estéril se removió la capa superior que contenía el plasma y las plaquetas. Con otra pipeta se transfirió la capa de células mononucleares (CMN) a otro tubo de 50 ml. Se lavaron las células tres veces con un exceso de PBS, centrifugándose 10 min a 1300 rpm.

### **Tratamiento de las células mononucleares con metil-ester de leucina (LO-ME)**

Se resuspendieron las CMN de sangre periférica en medio sin SFB a una densidad de  $5 \times 10^6$ /ml y se trataron con LO-ME 5 mM durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron 10 min a 1300 rpm y se lavaron tres veces con un exceso de PBS. El LO-ME es tóxico para las células fagocíticas (como macrófagos) y citotóxicas (como células NK), pero no para los linfocitos T o B.

### **Purificación de linfocitos T de sangre periférica por la técnica de rosetas con eritrocitos de carnero tratados con 2-aminoetilisotiouranio (AET)**

Las CMN tratadas con LO-ME se resuspendieron en medio con SFB (medio completo) a una densidad de  $1 \times 10^7$ /ml. Por cada 4 ml de suspensión de células se adicionaron 4 ml de eritrocitos de carnero (EC) al 4% tratados con AET y 2 ml de SFB inactivado por calor. El AET aumenta la unión de los linfocitos T con los eritrocitos de carnero. Se centrifugó la mezcla 5 min a 800 rpm a 4°C y se incubó 1 h en hielo. Una vez concluido este tiempo se colocaron 3 ml de Ficoll-Hypaque en un tubo de centrifuga de 15 ml y se adicionó la mezcla de CMN/SFB/EC, previamente resuspendida, centrifugándose durante 30 min a 2000 rpm y a 4°C. A continuación, se desechó el sobrenadante y el botón celular, que contenía las rosetas, fué resuspendido en solución de lisis durante un minuto. Se adicionó un exceso de PBS frío y se centrifugó la mezcla, se repitieron los lavados dos veces más y los linfocitos T purificados fueron resuspendidos finalmente en medio

completo. Se analizó la pureza de los linfocitos T por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-CD3 en un citómetro de flujo, obteniéndose purezas >97%.

### **Estimulación de linfocitos con anti-CD3 inmovilizado o con ionomicina/PMA**

Se incubaron placas de 96 pozos con el anticuerpo anti-CD3 64.1 (20 ng/pozo) en un volumen de 50  $\mu$ l de tris 0.05M pH 8.5 por 90 min a 37°C. Pasado este tiempo se hicieron tres lavados con PBS y se colocaron  $2 \times 10^5$  linfocitos T purificados por pozo en 200  $\mu$ l de medio completo. Las placas se incubaron durante 0, 6 y 24 hs. Posteriormente, se recuperaron las células y se hicieron tinciones por inmunofluorescencia para citometría de flujo. Por otra parte, se estimularon  $1 \times 10^6$  células mononucleares/pozo o  $2 \times 10^5$  linfocitos T purificados/pozo en placas de 24 o 96 pozos con ionomicina a 1.4 $\mu$ M y PMA a 10ng/ml durante 0, 6 y 24 hs. Después de este tiempo se recuperaron las células y se hicieron tinciones por inmunofluorescencia para ser analizadas por citometría de flujo.

### **Tinción de inmunofluorescencia para citometría de flujo**

Se colocaron  $1 \times 10^6$  CMN suspendidas en 50  $\mu$ l de solución de gamma globulina humana (4mg/ml) en placas de 96 pozos de fondo redondo y se incubaron por 30 min a 4°C. Se hicieron 3 lavados con 200  $\mu$ l de solución de lavado (PBS-suero humano normal-SHN-1%-EDTA 5mM-NaN<sub>3</sub> 0.1%). A continuación, las muestras se tiñeron para inmunofluorescencia de dos colores: para la primera tinción se emplearon anticuerpos marcados con FITC (FL-1), para los marcadores CD3, CD4, CD8, CD40/CD19 ó CD56. Para la segunda tinción se utilizó un anticuerpo biotinilado, para la molécula CD40L, seguido de estreptoavidina marcada con ficoeritrina (FL-2). Entre cada incubación se hicieron tres lavados exhaustivos con la solución de lavado. Posteriormente, las muestras se resuspendieron en 400 $\mu$ l de yoduro de propidio (IP) a 100  $\mu$ g/ml y se analizaron en un citómetro de flujo (FACSort de Becton Dickinson) con el software "Lysis II".

El equipo mide y analiza las propiedades ópticas de células individuales que pasan a través de un rayo laser. Dependiendo de

como interactúan las células con el rayo laser, un citómetro de flujo puede medir cinco parámetros para cada célula: tamaño (forward scatter, FCS), complejidad (side scatter, SSC) y tres emisiones de fluorescencia (FL-1, FL-2 y FL-3). Un sistema óptico-electrónico convierte las señales ópticas de las células en señales de voltaje. La señal de voltaje es traducida en un valor digital el cual es almacenado en un computadora. Los datos son posteriormente recuperados y analizados utilizando programas de computación como el "software Lysis II", que agrupa la información de múltiples células en gráficas estadísticas, las cuales analizan parámetros individuales (histogramas) o dos parámetros a la vez (gráficas de puntos, densidad ó contorno)<sup>65</sup>.

Para nuestro estudio, la muestra control se analizó en una gráfica de puntos de FCS vs SSC, donde se delimitó una ventana en el trazo de barrido longitudinal vs barrido de 90 grados en la región correspondiente a los linfocitos (ver figura A), excluyéndose otros tipos celulares como monocitos y granulocitos. La población seleccionada se analizó en un histograma para IP (FL-3), para excluir células muertas, que son positivas al IP (fluorescencia roja, ver figura B). Posteriormente las muestras problema se adquirieron bajo estas condiciones de selección.

Las tinciones de linfocitos T purificados se realizaron en las mismas condiciones, a excepción de la incubación con gamma globulinas humanas.

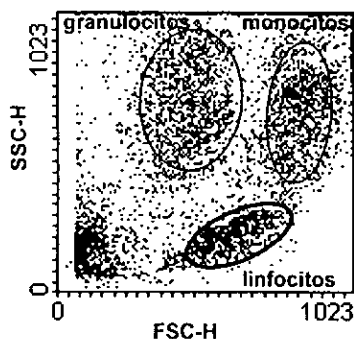


FIGURA A. Gráfica de puntos

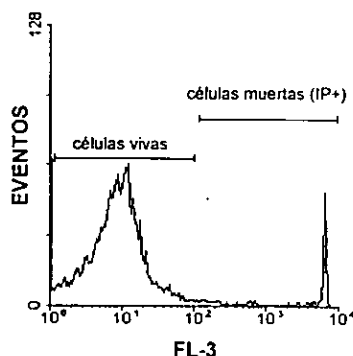


FIGURA B. Histograma para yoduro de propidio

### Análisis estadístico de los resultados

Para un análisis estadístico adecuado, los pacientes se clasificaron de acuerdo a la actividad de la enfermedad (SLEDAI) en tres grupos: de baja (SLEDAI  $\leq 8$ ), mediana (SLEDAI 9-14) y alta actividad (SLEDAI  $>14$ ). Para cada grupo, los resultados fueron analizados con la prueba *t* de student, con valores de  $p < 0.01$  para indicar diferencias estadísticamente significativas con respecto a un control de individuos sanos. El análisis estadístico se realizó con Excel de Microsoft office.

## 8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 8.1. Pacientes

Para el presente estudio se analizaron 17 pacientes con LES con distintos grados de actividad y 5 individuos sanos como controles. La **tabla 1** describe algunas de las características de los 17 pacientes: como puede observarse los pacientes 4 y 10 son debutantes, con diagnóstico reciente de LES y sin tratamiento en el momento de la toma de muestra, los demás pacientes tenían diferentes tiempos de evolución de la enfermedad y en el momento de la toma de muestra estaban sin tratamiento o consumían esteroides a bajas dosis. Los controles son individuos sanos entre los 24 y 45 años, 3 de los cuales son mujeres.

PACIENTES	SEXO	EDAD	SLEDAI	TRATAMIENTO (mg/día)	TIEMPO DE EVOLUCIÓN
1	F	35	4	N	6 años
2	F	20	7	Prednisona (10)	3 años
3	F	27	8	N	6 meses
4	F	23	8	N	5 meses, de recién diagnóstico
5	F	37	8	Prednisona (15)	11 años
6	F	55	12	Prednisona (5)	1 año
7	F	ND	12	N	ND
8	M	35	12	N	2 años
9	F	37	12	Prednisona (10)	2 meses
10	F	35	12	N	1 año, de recién diagnóstico
11	F	35	14	Prednisona (5)	16 años
12	F	24	14	Prednisona (30)	1 año
13	F	ND	21	N	ND
14	F	17	22	Prednisona (5)	2 años
15	F	22	24	Prednisona (20)	6 meses
16	F	18	25	N	2 años
17	F	ND	32	N	ND

N= sin tratamiento, ND= no determinado



## 8.2. Expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES.

Las **tablas 2 y 3** describen los resultados obtenidos al analizar por doble inmunofluorescencia las CMN de los 17 pacientes con LES y de los individuos sanos. En la **tabla 2** se observan las medias  $\pm$  desviación estandar de los porcentajes de células que expresan CD40L en las subpoblaciones celulares CD3+ (linfocitos T totales), CD4+ (linfocitos T inductores), CD8+ (linfocitos T citotóxicos), CD40/CD19+ (linfocitos B) ó CD56+ (células NK) de pacientes con baja, mediana y alta actividad. Los porcentajes totales, obtenidos de tinciones sencillas, para cada una de las subpoblaciones fueron considerados como el 100%. La prueba *t* de student no indicó diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con LES (de baja, mediana y alta actividad) y los individuos sanos para la expresión de CD40L en las diferentes subpoblaciones con valores de  $p > 0.01$ .

Similarmente, la **tabla 3** indica las medias  $\pm$  desviación estandar de los porcentajes de células que expresan el RIL-2, como un marcador de activación, por las mismas poblaciones celulares. La expresión de CD25 fué observada en pacientes y en controles, no habiendo diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p > 0.01$ . Lo anterior indica que los linfocitos de los pacientes con LES no estaban activados.

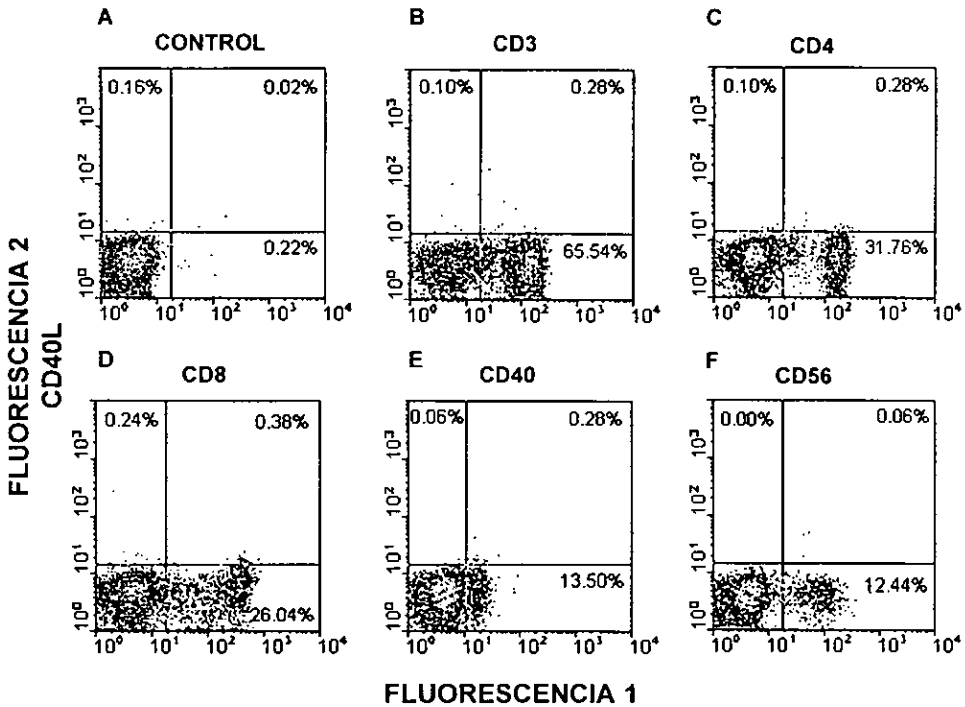
Las **figuras 3 y 4** muestran, como ejemplos, los resultados de tinciones de doble fluorescencia, para la expresión de CD40L, en un control sano y en un paciente con LES activo respectivamente. Los cuadrantes en las gráficas de puntos indican los porcentajes de células dobles positivas para CD40L con los diferentes marcadores, en los que se observa que no hay expresión de CD40L. Las **figuras 5 y 6** indican de manera similar la expresión del RIL-2, por las diferentes subpoblaciones de linfocitos, en un control sano y en un paciente con LES activo respectivamente, en donde encontramos que los linfocitos T CD4+ y los linfocitos B (CD40/CD19) tienen un nivel basal de expresión del RIL-2.

	Porcentajes de células que expresan CD40L en las poblaciones celulares:				
	CD3	CD4	CD8	CD40/CD19	CD56
Control (individuos sanos)	x= 0.18±0.17 (n=5)	x= 0.27±0.25 (n=5)	x= 0.13±0.16 (n=4)	x= 0.33±0.18 (n=5)	x=0.1±0.07 (n=3)
Grupo 1 (pacientes de baja actividad)	x= 0.24±0.46 (n=5)	x= 0.11±0.18 (n=5)	x=0.55±0.75 (n=5)	x= 0.04±0.02 (n=4)	x=0.02±0.02 (n=4)
Grupo 2 (pacientes de mediana actividad)	x= 0.81±0.61 (n=7)	x= 1.16±1.52 (n=7)	x= 0.53±0.50 (n=6)	x= 0.47±0.32 (n=7)	x=0.18±0.13 (n=6)
Grupo 3 (pacientes de alta actividad)	x= 0.39±0.39 (n=5)	x= 0.35±0.18 (n=5)	x= 0.86±0.81 (n=5)	x= 0.25±0.28 (n=5)	x=0.27±0.25 (n=4)

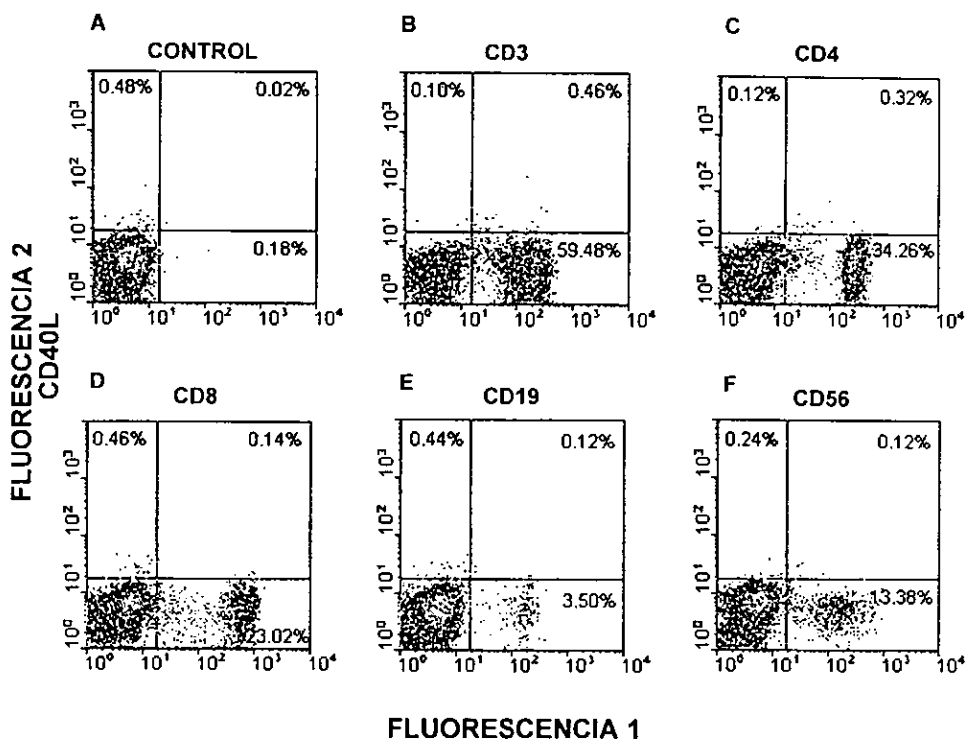
Tabla 2. Valores de medias  $\pm$  desviación estandar de los porcentajes de células que expresan CD40L en las poblaciones CD3, CD4, CD8, CD40 y CD56. El número de individuos estudiados por grupo es indicado en ( ), los valores de p para cada grupo en las diferentes subpoblaciones fueron todos  $p>0.01$ .

	Porcentajes de células que expresan el RIL-2 en las poblaciones celulares:			
	CD3	CD4	CD8	CD40/CD19
Control (individuos sanos)	x=23.99±9.30 (n=5)	x=31.99±14.58 (n=5)	x=3.35±2.51 (n=5)	x=32.42±15.87 (n=5)
Grupo 1 (pacientes de baja actividad)	x= 22.86±8.55 (n=5)	x=36.83±19.62 (n=5)	x=2.95±2.34 (n=4)	x=14.78±8.09 (n=2)
Grupo 2 (pacientes de mediana actividad)	x=28.53±13 (n=7)	x=36.09±21.45 (n=6)	x=2.76±2.22 (n=5)	x=21.64±11.10 (n=6)
Grupo 3 (pacientes de alta actividad)	x=21.71±12.91 (n=5)	x=37.60±13.40 (n=5)	x=1.16±0.97 (n=5)	x=16.02±6.98 (n=5)

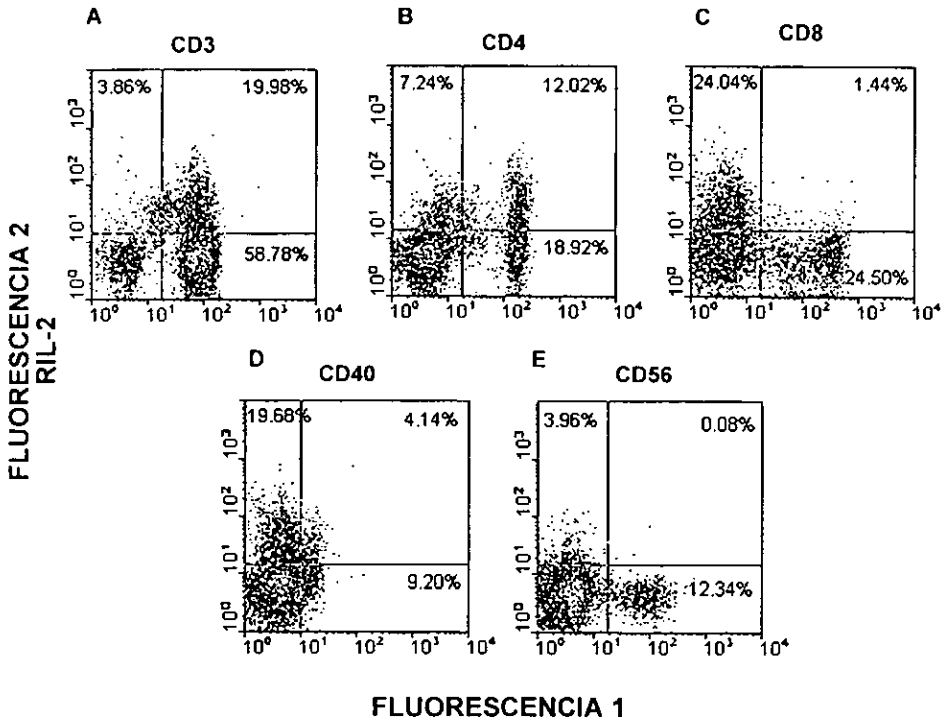
Tabla 3. Valores de medias  $\pm$  desviación estandar de los porcentajes de células que expresan el RIL-2 en las poblaciones CD3, CD4, CD8 y CD40. El número de individuos estudiados por grupo es indicado en ( ), los valores de p para cada grupo en las diferentes subpoblaciones fueron todos  $p>0.01$ .



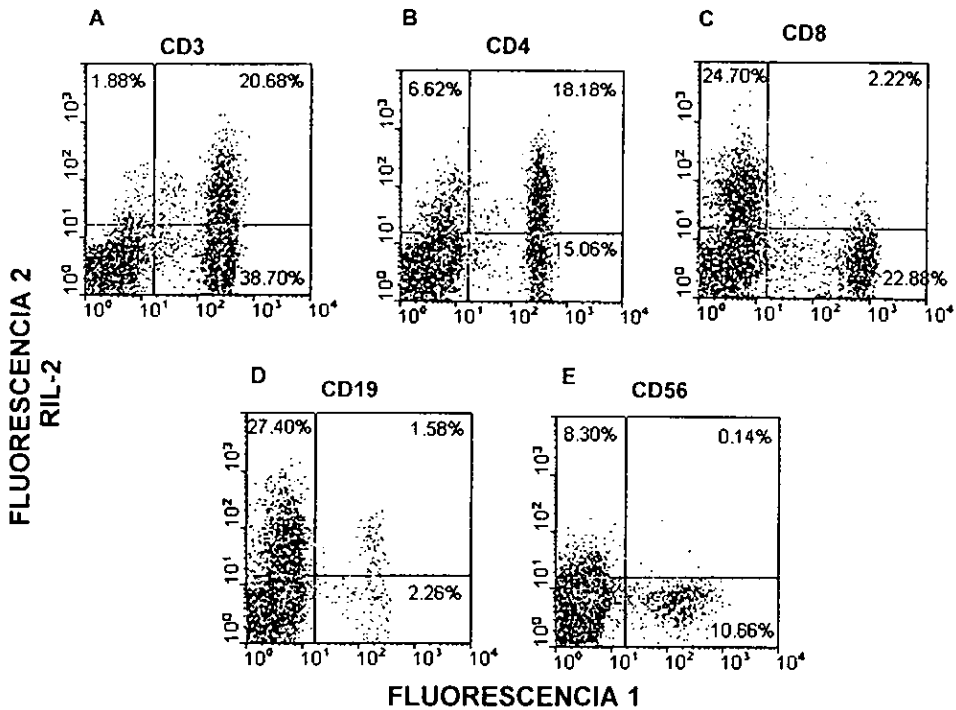
**FIGURA 3. Expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de un individuo sano.** La figura muestra tinciones de doble fluorescencia de CMN de sangre periférica obtenidas de un individuo sano y analizadas por citometría de flujo. En el eje de las X se muestra la primera tinción con diferentes anticuerpos marcados con FITC (fluorescencia 1). Mientras que en el eje de Y se muestra la segunda tinción con un anticuerpo anti-CD40L biotinilado, seguido de estreptoavidina marcada con ficoeritrina (fluorescencia 2): **A** es una tinción control con anticuerpos irrelevantes marcados con FITC y PE; **B**, **C** y **D** son tinciones con anticuerpos para las subpoblaciones de linfocitos T CD3, CD4 y CD8 respectivamente; **E** es una tinción para la subpoblación de linfocitos B con un anticuerpo para CD40/CD19; y **F** es una tinción para la subpoblación de linfocitos NK con un anticuerpo anti CD56. Los cuadrantes en las gráficas de puntos indican los porcentajes de células dobles positivas para CD40L con los diferentes marcadores. Se muestra un ejemplo representativo de 5 controles analizados.



**FIGURA 4. Expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de un paciente con LES.** La figura muestra tinciones de doble fluorescencia de CMN de sangre periférica obtenidas de un paciente con LES activo y analizadas por citometría de flujo. En el eje de las X se muestra la primera tinción con diferentes anticuerpos marcados con FITC (fluorescencia 1). Mientras que en el eje de Y se muestra la segunda tinción con un anticuerpo anti-CD40L biotinilado, seguido de estreptoavidina marcada con ficoeritrina (fluorescencia 2): **A** es una tinción control con anticuerpos irrelevantes marcados con FITC y PE; **B, C, D, E y F** son gráficas de puntos de tinciones dobles para CD40L con los marcadores CD3, CD4, CD8, CD40/CD19 y CD56 respectivamente, tal como se describe en la figura 1. Los cuadrantes en las gráficas de puntos muestran los porcentajes de células dobles positivas para CD40L con los diferentes marcadores. Se presenta un ejemplo de 17 pacientes analizados.



**FIGURA 5. Expresión del RIL-2 por linfocitos de sangre periférica de un individuo sano.** La figura muestra tinciones de doble fluorescencia de CMN de sangre periférica obtenidas de un individuo sano y analizadas en un citómetro de flujo. En el eje de X se muestra la primera tinción con diferentes anticuerpos marcados con FITC (fluorescencia 1). Mientras que en el eje de Y se muestra la segunda tinción con anti-CD25 biotinilado, seguido de estreptoavidina marcada con ficoeritrina (fluorescencia 2). A, B, C, D y E son gráficas de puntos que representan tinciones dobles del RIL-2 con los marcadores CD3, CD4, CD8, CD40/CD19 y CD56 respectivamente. Los cuadrantes en las gráficas de puntos muestran los porcentajes de células dobles positivas para el RIL-2 con los diferentes marcadores. Se da un ejemplo representativo de 5 controles analizados.



**FIGURA 6. Expresión del RIL-2 por linfocitos de sangre periférica de un paciente con LES.** La figura muestra tinciones de doble fluorescencia de CMN de sangre periférica obtenidas de un paciente con LES activo y analizadas en un citómetro de flujo. En el eje de X se muestra la primera tinción con diferentes anticuerpos marcados con FITC (fluorescencia 1). Mientras que en el eje de Y se muestra la segunda tinción con anti-CD25 biotinilado, seguida de estreptoavidina marcada con ficoeritrina (fluorescencia 2). A, B, C, D y E son gráficas de puntos que representan tinciones dobles del RIL-2 con los marcadores CD3, CD4, CD8, CD40/CD19 o CD56 respectivamente. Los cuadrantes en las gráficas de puntos muestran también los porcentajes de células dobles positivas para el RIL-2 con los diferentes marcadores. Se da un ejemplo representativo de 17 pacientes.

### 8.3. Expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES bajo diferentes estímulos

Los resultados mostrados hasta aquí indican que no hay expresión de CD40L por linfocitos T ni B de pacientes con LES. A continuación nuestro interés se enfocó en analizar la cinética de expresión de CD40L por linfocitos totales y linfocitos T purificados bajo diferentes estímulos.

#### a. Expresión inducida de CD40L por linfocitos totales.

Inicialmente las CMN totales de 3 pacientes con LES (SLEDAI 7, 12 y 32) y de controles normales, tratadas con LO-ME (por lo tanto, libres de monocitos), fueron estimuladas con ionomicina 1.4  $\mu$ M y PMA 10 ng/ml. Se tomaron muestras de  $1 \times 10^6$  células a los tiempos 0, 6 y 24 h para análisis por doble inmunofluorescencia. Como en los estudios previos, para la primera tinción se emplearon anticuerpos marcados con FITC anti-CD3, CD4, CD8 ó CD40/CD19 y para la segunda tinción se empleó un anticuerpo anti-CD40L biotinilado, seguido de estreptavidina marcada con ficoeritrina.

Pacientes	% de células dobles positivas para CD40L y CD3 a los tiempos:		
	0 h	6 h	24 h
1 (SLEDAI=7)	0.02	38.76	21.2
2(SLEDAI=32)	0.28	28.88	6.14
3 (SLEDAI=12)	0.06	25.88	12.2
Control 1	0	56.08	25.7
Control 2	0.48	48.06	2.92
Control 3	0.2	54.44	38.7

Tabla 5. Cinética de expresión de CD40L

Como puede apreciarse en la **tabla 5**, la cinética de expresión de CD40L con dosis óptimas de ionomicina/PMA es muy semejante en estos tres pacientes y controles, habiendo una máxima expresión de CD40L a las 6 h con una disminución a las 24 h sin llegar a su nivel basal. Además, los porcentajes de las células dobles positivas para los marcadores CD40L y CD3 a las 6 y 24 h, en pacientes, no es mayor que en los controles.

En las **figuras 7 y 8** se muestran, como ejemplos, la cinética de expresión de CD40L en respuesta a ionomicina/PMA por linfocitos de un control sano y un paciente con LES respectivamente (SLEDAI=32), en las poblaciones CD3+, CD4+ o CD8+. Como puede verse, tanto en el paciente como en el control aproximadamente el 50% de la población CD3 expresa CD40L a las 6 h, mientras que en la población CD8+ solo el 8% expresa CD40L a este tiempo. Durante la cinética de expresión de CD40L observamos una disminución de la población CD4 y un aumento en el porcentaje de células positivas para CD40L al tiempo 6 y 24 h. Estos resultados se obtuvieron en los otros dos pacientes.

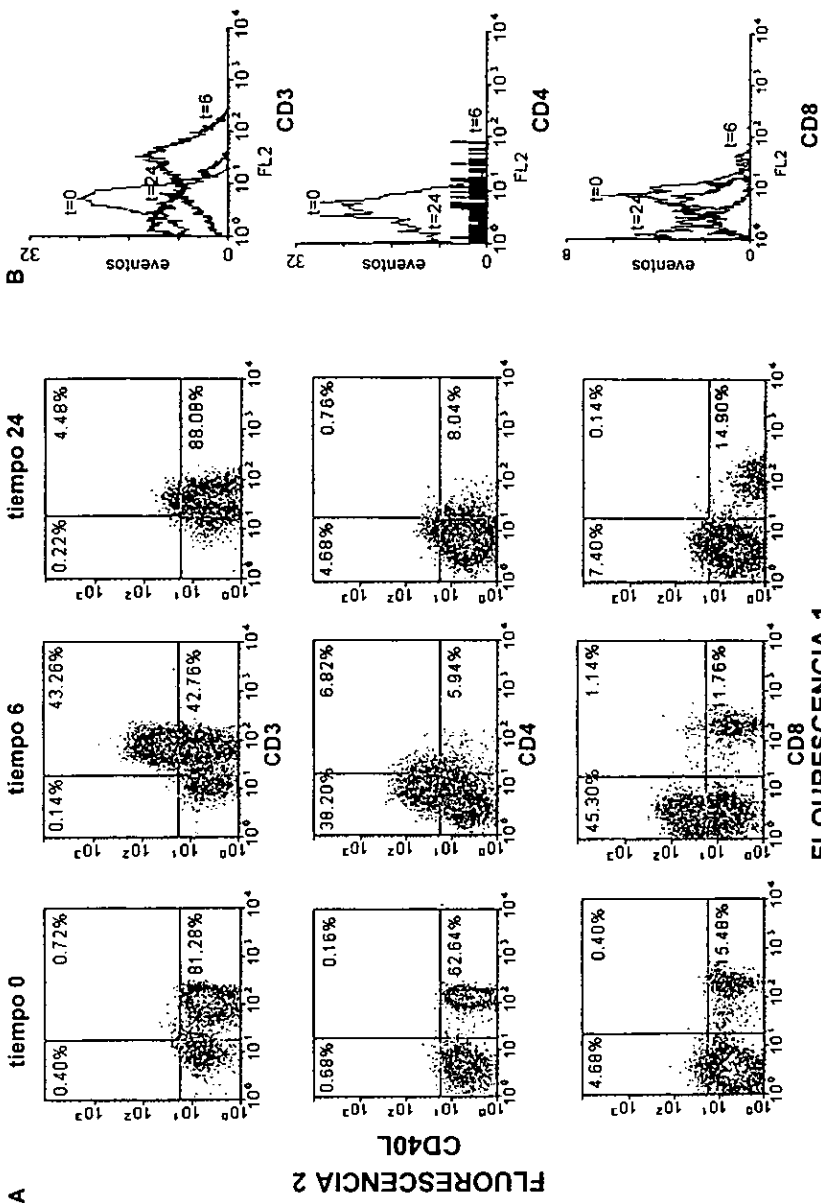
Para ver si los linfocitos de estos pacientes con LES bajo estos estímulos presentaban una mayor activación con respecto a sus controles, se midió la expresión de CD25 al mismo tiempo que se midió la expresión de CD40L. En la **tabla 6** se muestran los porcentajes de las células dobles positivas para el RIL-2 con CD3 a las 0, 6 y 24 h: se observa que en estos tres pacientes los porcentajes de células dobles positivas no son mayor con respecto a los controles. También vemos que la cinética de expresión del RIL-2 es muy semejante en pacientes y controles, con una expresión basal del RIL-2 al tiempo 0 y una expresión máxima a las 24 hs. Los resultados indican, que por lo menos en estos tres pacientes no hay una mayor activación de los linfocitos con respecto a su control bajo estos estímulos.



Pacientes	% de células dobles positivas para el RIL-2 y CD3 a los tiempos:		
	0h	6h	24h
1 (SLEDAI=7)	6.3	7.16	49.4
2 (SLEDAI=12)	6.92	10.72	48.8
3 (SLEDAI=32)	17.68	30.88	32
control 1	4.08	7	36.3
control 2	4.3	10.3	52.1
control 3	25.2	14.4	88.9

**Tabla 6.** Cinética de expresión del RIL-2

Las **figuras 9 y 10** muestran, como ejemplos, la cinética de expresión de CD25 en respuesta a ionomicina/PMA por linfocitos de un control y un paciente con LES respectivamente en las poblaciones CD3+, CD4+ o CD8+. Tanto en el paciente como en el control aproximadamente el 50% de la población CD3 expresa el RIL-2 a las 24 h. Similarmente, que para la cinética de expresión de CD40L, observamos una disminución de la población CD4 y un aumento de la población positiva para el RIL-2 a las 6 y 24 h. Estos resultados fueron obtenidos para los otros dos pacientes. La disminución de la población CD4 observada en la cinética de expresión de CD40L y el RIL-2 a las 6 y 24 hs es explicada por la internalización de la molécula CD4 por efecto del PMA, a través de señales de endocitosis dependientes de fosforilación localizadas en el dominio carboxilo terminal de esta molécula<sup>67</sup>.



**FIGURA 7.** Cinética de expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de un individuo sano. CMN tratadas con LOMe, se estimularon con ionomicina-PMA durante 0, 6 y 24 h, después de lo cual se analizaron por inmunofluorescencia en dos colores en un citómetro de flujo. En A se muestra la cinética de expresión de CD40L al tiempo 0, 6 y 24 h en gráficas de puntos para los marcadores CD3, CD4 y CD8. En B se muestra la cinética de expresión de CD40L en las poblaciones CD3, CD4 y CD8 en forma de histogramas. Se presenta un ejemplo representativo de 3 controles analizados.

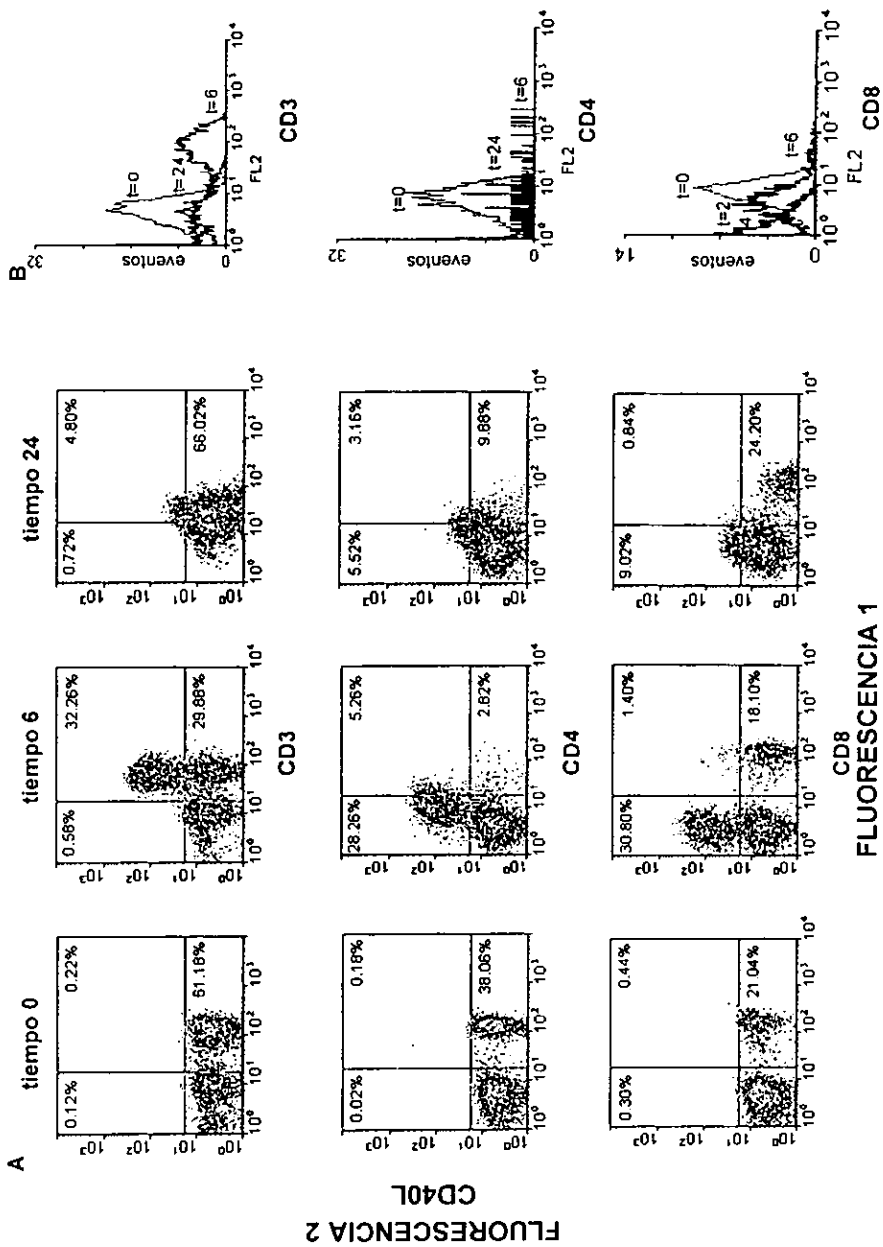
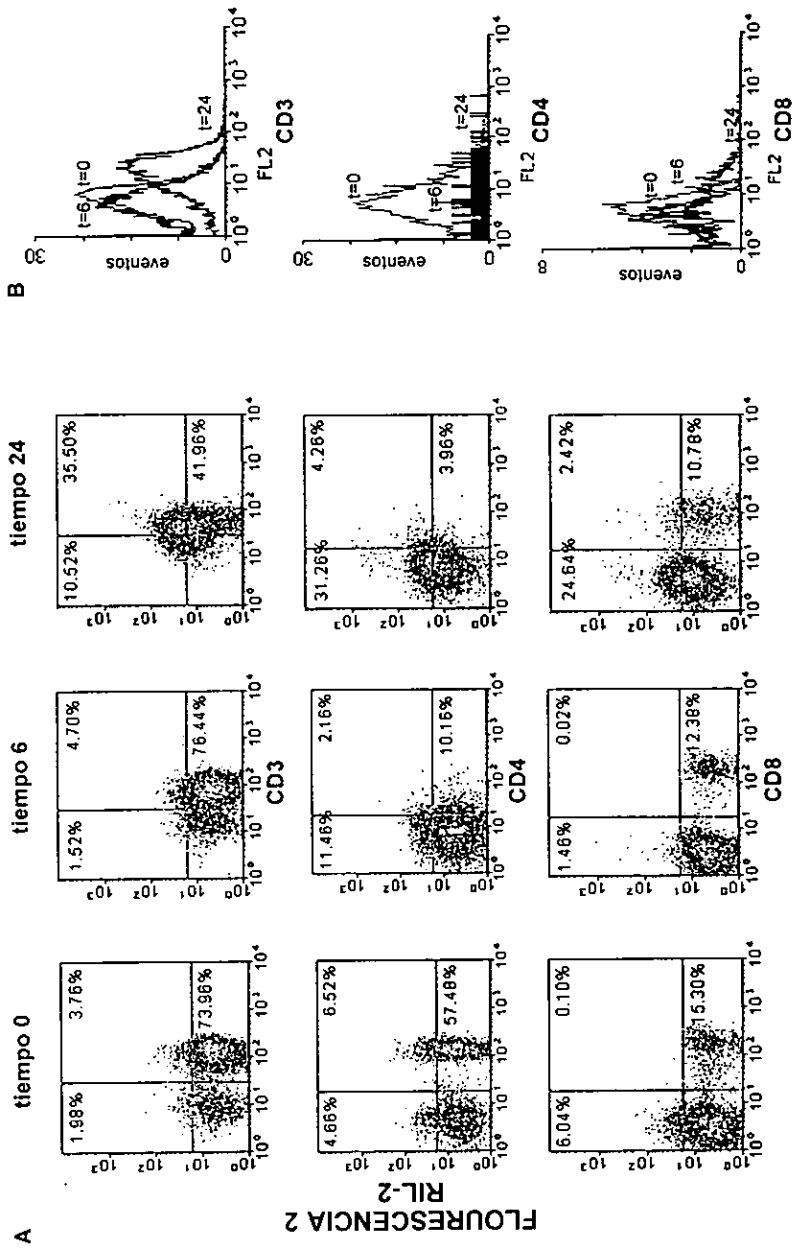
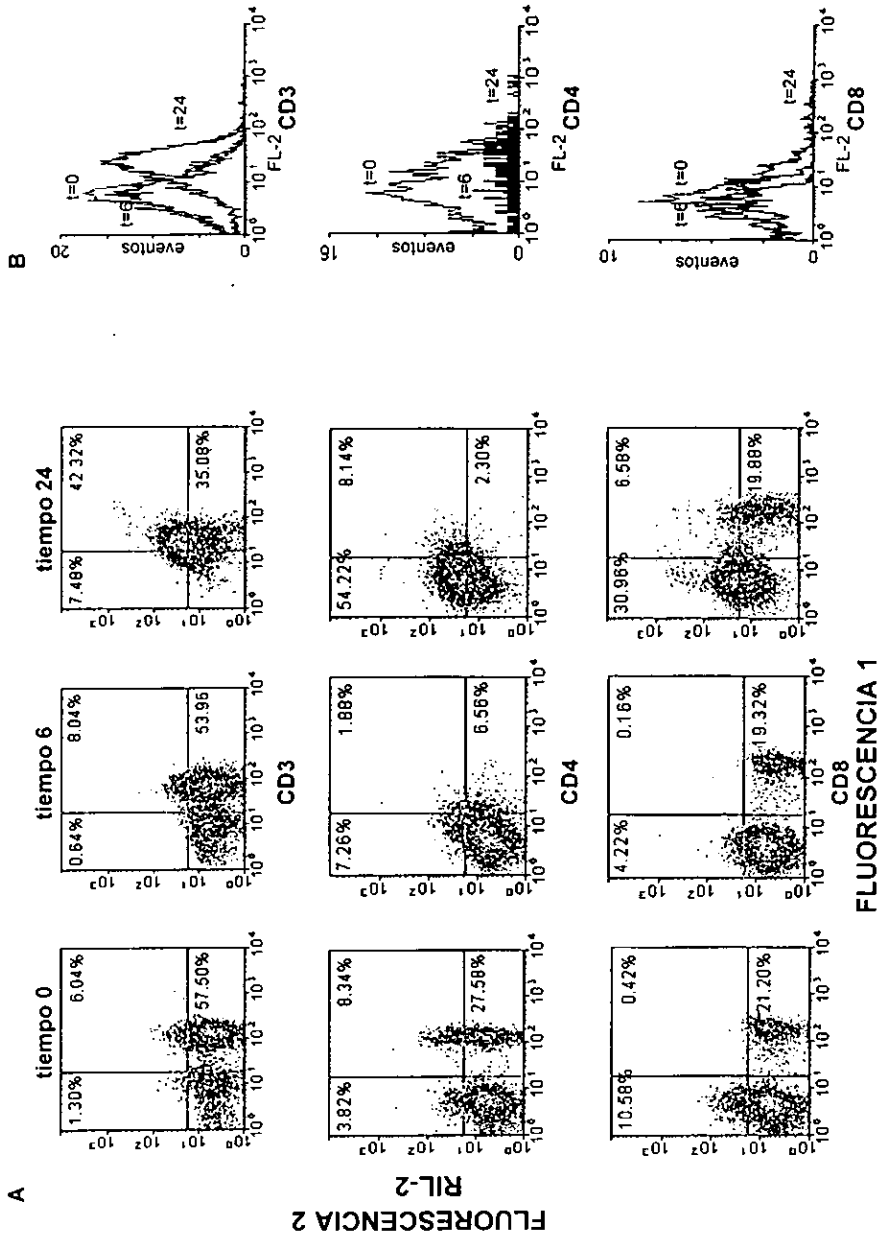


FIGURA 8. Cinética de expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de un paciente con LES. CMN tratadas con LOMe se estimularon con ionomicina/PMA durante 0, 6 y 24 h, después de lo cual se analizaron por inmunofluorescencia en dos colores en un citómetro de flujo. En A se muestra la cinética de expresión de CD40L al tiempo 0, 6 y 24 h en gráficas de puntos para los marcadores CD3, CD4 y CD8. En B se muestra la cinética de expresión de CD40L en las poblaciones CD3, CD4 y CD8 en forma de histogramas. Se presenta un experimento representativo de 3 pacientes analizados.



**FLUORESCENCIA 1**

**FIGURA 9.** Cinética de expresión del RIL-2 por linfocitos de sangre periférica de un individuo sano. CMN tratadas con LOMe se estimularon con ionomicina-PMA durante 0, 6 y 24 h, después de lo cual se analizaron por inmunofluorescencia en dos colores en un citómetro de flujo. En A se muestra la cinética de expresión del RIL-2 al tiempo 0, 6 y 24 h en gráficas de puntos para los marcadores CD3, CD4 y CD8. En B se muestra la cinética de expresión del RIL-2 por las poblaciones CD3, CD4 y CD8 en forma de histogramas. Se presenta un ejemplo representativo de 3 controles analizados.

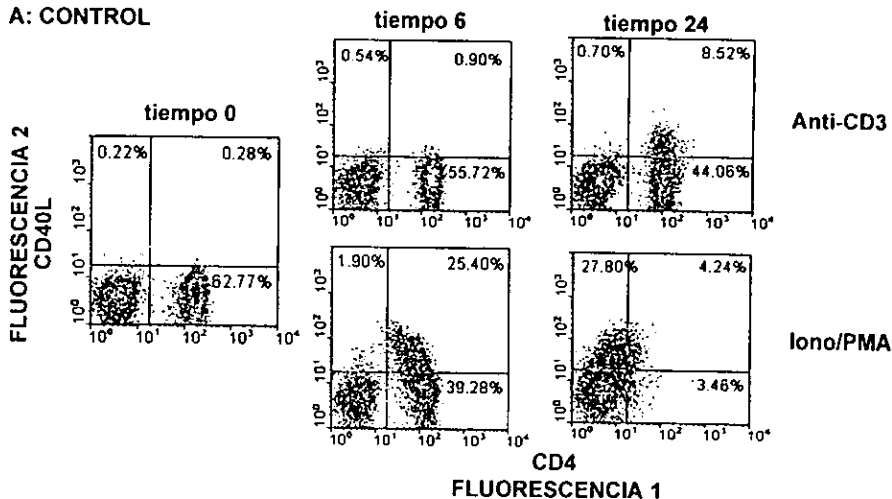


**FIGURA 10.** Cinética de expresión del RIL-2 por linfocitos de sangre periférica de un paciente con LES. CMN tratadas con LOMe se estimularon con ionomicina-PMA durante 0, 6 y 24 h, después de lo cual se analizaron por inmunofluorescencia en dos canales en un citómetro de flujo. En A se muestra la cinética de expresión del RIL-2 al tiempo 0, 6 y 24 h en gráficas de puntos para los marcadores CD3, CD4 y CD8. En B se muestra la cinética de expresión del RIL-2 en las poblaciones CD3, CD4 y CD8 en forma de histogramas. Se presenta un experimento representativo de 3 pacientes analizados.

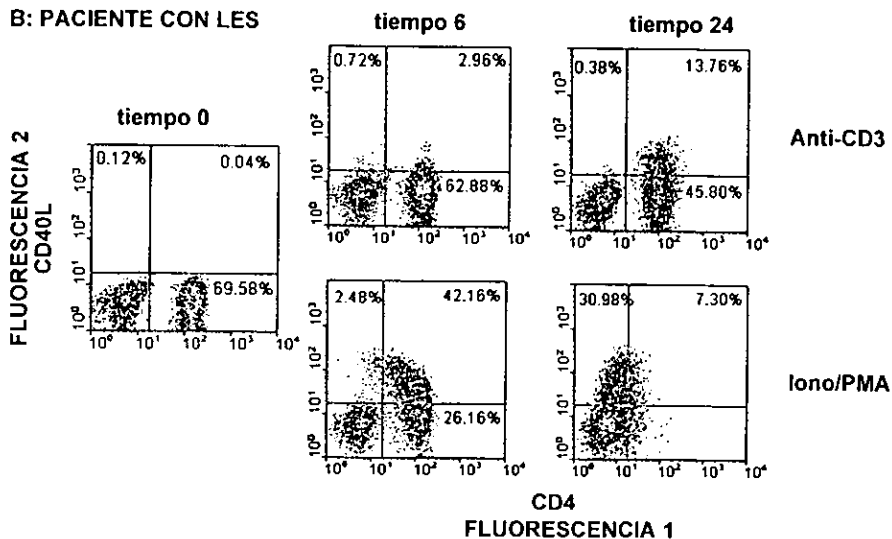
## b. Expresión inducida de CD40L por linfocitos T purificados

Para descartar la posibilidad de que las moléculas de otras células CD40+ pudieran estar inhibiendo la expresión de CD40L, se purificaron los linfocitos T de un paciente con índice de actividad elevado (SLEDAI=32) y se estimularon con ionomicina/PMA ó anti-CD3 inmovilizado en placa durante 0, 6 y 24 h. En la **figura 11** se muestra la cinética de expresión de CD40L en la población CD4+ bajo estos estímulos en un control y en un paciente con resultados similares. Con el estímulo de anti-CD3, la máxima expresión de CD40L fue a las 24 h, mientras que con el estímulo de iono/PMA la máxima expresión de CD40L fue a las 6 h. En la **Figura 12** se muestra la cinética de expresión de CD25 en la población CD4+ para este mismo control y paciente con resultados similares. Con el estímulo de anti-CD3, la máxima expresión de CD25 fué a las 24 h, mientras que con el estímulo de iono/PMA hay una aumento en la expresión de CD25 a las 6 h. Como en los casos anteriores se observa una disminución de la población CD4 a las 24 h bajo el estímulo de ionomicina/PMA.

**A: CONTROL**

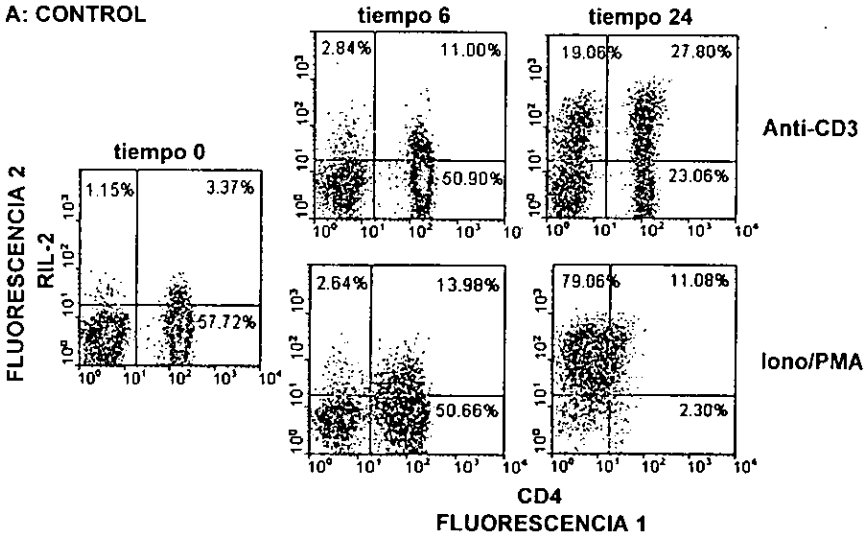


**B: PACIENTE CON LES**

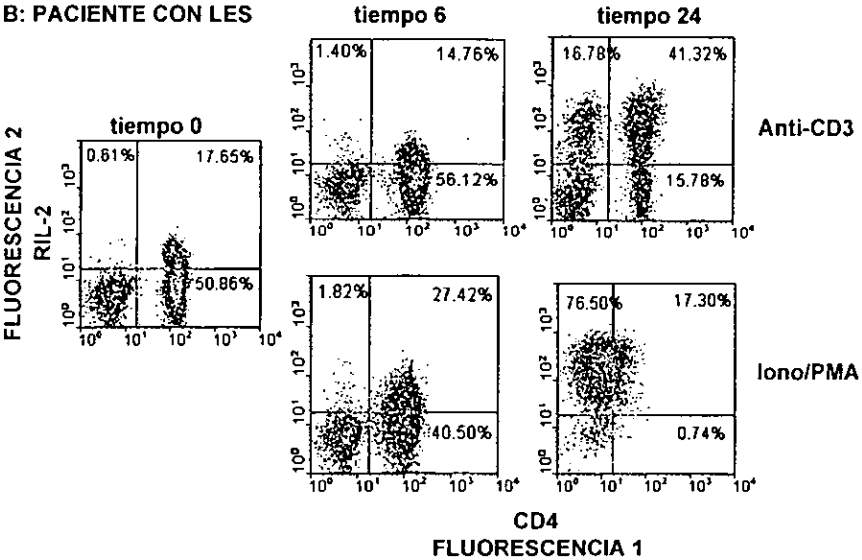


**FIGURA 11.** Cinética de expresión de CD40L por linfocitos T purificados de un paciente con LES. Linfocitos T purificados por el método de rosetas fueron estimulados con ionomicina/PMA y/o anti-CD3 durante 0, 6 y 24 h, después de lo cual se analizaron por inmunofluorescencia en dos colores en un citómetro de flujo. En la figura se muestra la cinética de expresión de CD40L en la población CD4+ en un control A y en un paciente B bajo estos estímulos.

**A: CONTROL**



**B: PACIENTE CON LES**



**FIGURA 12. Cinética de expresión del RIL-2 por linfocitos T purificados de un paciente con LES.** Linfocitos T purificados por el método de rosetas fueron estimulados con ionomicina/PMA y/o anti-CD3 durante 0, 6 y 24 h, después de lo cual se analizaron por inmunofluorescencia en dos colores en un citómetro de flujo. En la figura se muestra la cinética de expresión del RIL-2 en la población CD4<sup>+</sup> en un control A y en un paciente B bajo estos estímulos.



## 9. DISCUSION

La interacción CD40-CD40L es una de las señales coestimuladoras mejor caracterizadas para la activación de linfocitos B en la respuesta humoral timodependiente. En el LES, la interacción CD40-CD40L, parece tener un papel importante en la producción de autoanticuerpos patogénicos, característicos de la enfermedad<sup>55-57</sup>. Sin embargo, dada la complejidad de la enfermedad, el mecanismo por el cual la interacción CD40-CD40L participa en la activación de los linfocitos B autoreactivos no ha sido definido. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el papel de la interacción CD40-CD40L en la patogenia del LES, para lo cual nos enfocamos en analizar la expresión de CD40L en la superficie de linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES con distintos grados de actividad, comparando con la expresión de CD25 como un indicador de actividad.

De acuerdo con nuestros resultados podemos concluir lo siguiente: 1) No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CD40L entre pacientes, independientemente del grado de actividad y los controles y 2) La cinética de expresión de CD40L por linfocitos de pacientes con LES bajo diferentes estímulos tiene un comportamiento similar al de los controles sanos.

La participación de la interacción CD40-CD40L en la patogenia de LES ha sido estudiada en modelos animales y en humanos. En ambos casos se han encontrado clones autorreactivos de linfocitos inductores capaces de facilitar la producción de autoanticuerpos patogénicos anti-DNA al ser cocultivadas con linfocitos B autólogos<sup>52,59</sup>. Aunque esto no ha sido siempre confirmado, lo cual no es sorprendente, dada la heterogeneidad de la enfermedad.

Cuando se han secuenciado los genes de los autoanticuerpos del LES humano y murino se ha encontrado que tienen mutación somática<sup>54,51</sup>. Esto es una evidencia indirecta de selección por el antígeno. Por otro lado, los autoanticuerpos patogénicos son del isotipo IgG, lo cual indica, también en forma indirecta, la participación de la interacción CD40-CD40L, muy probablemente de los linfocitos T y B específicos contra los autoantígenos relevantes en la patogenia del LES. Sin embargo, algunos hallazgos, como la expresión generalizada de

CD40L por linfocitos T y B de sangre periférica en pacientes con LES, sugerirían que la señal CD40-CD40L en LES podría ser inespecífica<sup>61,62</sup>.

En este estudio encontramos que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES no expresan CD40L en forma espontánea. Los resultados coinciden parcialmente con un estudio en 19 pacientes, donde no se encontraron diferencias significativas, para la expresión de CD40L, con respecto a los controles, aunque en tres de los pacientes en dicho estudio si hubo un aumento en la expresión de CD40L en los linfocitos T CD4+<sup>62</sup>. En nuestro estudio, además de no encontrar expresión de CD40L en los linfocitos T CD3+ de pacientes con LES, tampoco encontramos expresión significativa de CD40L en los linfocitos B, a diferencia del grupo de Datta quienes en 9 pacientes encontraron un gran número de linfocitos T y B que expresaban CD40L en su membrana<sup>61</sup>. Los resultados obtenidos por el grupo de Datta sugieren una activación policlonal en los linfocitos de los pacientes con LES, mientras que nuestros resultados sugieren que no hay activación policlonal.

El hecho de no encontrar expresión espontánea de CD40L en los linfocitos de pacientes con LES es apoyado por algunos factores que se tomaron en cuenta durante el análisis: Los 17 pacientes analizados no consumían esteroides o lo hacían en bajas dosis, lo cual descarta la posibilidad de una inhibición de la expresión de CD40L por efecto de los esteroides. Por otra parte el tiempo de evolución de los pacientes analizados fue variable, incluyendo pacientes debutantes, y en ninguno de ellos se encontró expresión de CD40L, lo cual excluye la posibilidad de que la expresión de CD40L pueda darse solo al inicio de la enfermedad. Los pacientes de acuerdo al índice de actividad de la enfermedad se clasificaron en pacientes de baja, mediana y alta actividad, en ninguno de los tres grupos se encontró expresión de CD40L.

Una posibilidad para explicar la ausencia de CD40L en este estudio sería que al examinar en conjunto linfocitos T y B, estos últimos estuvieran inhibiendo la expresión de CD40L, inducida por CD40, tal como ha sido publicado<sup>66</sup>. Para excluir dicha posibilidad, se

examinaron los linfocitos T purificados de un paciente con gran actividad del LES, en quien tampoco se encontró expresión de CD40L en el tiempo basal. Por lo tanto, no consideramos que la ausencia de expresión sea por un efecto inhibitorio *in vitro* por CD40.

Como un control importante, al mismo tiempo que se analizó la expresión de CD40L se analizó la expresión del RIL-2, como un marcador de activación. Los resultados para los 17 pacientes demuestran que no hay diferencias con respecto a los controles, indicando que los linfocitos de los pacientes con LES no estaban activos.

Así, con nuestros datos y aquellos publicados no se puede explicar la base de las diferencias encontradas. Posiblemente en el estudio de Datta, la expresión se deba a aspectos técnicos, dado que ellos examinaron células fijadas con formaldehído, lo cual puede, en ocasiones, resultar en fluorescencia inespecífica, además, a diferencia de nuestro estudio, ellos no excluyeron del análisis las células muertas, las cuales pueden ser también una fuente de fluorescencia inespecífica y resultados falsos positivos.

El análisis de la cinética de expresión de CD40L y CD25, bajo el estímulo de ionomicina/PMA, mostró un comportamiento muy similar en pacientes y en controles. Para la expresión de CD40L, los resultados son semejantes a los obtenidos por el grupo de Datta quienes encontraron que la cinética de expresión de CD40L, por linfocitos T CD4+ de líneas celulares obtenidas de pacientes con LES, bajo el estímulo de ionomicina/PMA, es muy semejante a los individuos sanos. Sin embargo, cuando CMN de pacientes con LES son estimuladas con anti-CD3 durante 18 h, se observa un gran número de linfocitos T CD4+ que expresan CD40L con respecto a los controles<sup>61</sup>. De manera contraria a nuestros resultados el grupo de Mary Crow encontró una cinética de expresión de CD40L alterada en pacientes con LES bajo el estímulo de ionomicina/PMA<sup>62</sup>. La cinética de expresión de CD25, en los tres pacientes con LES estudiados, indicó que los porcentajes de células CD3, CD4 y CD8 positivas para CD25 no fueron mayores que los controles, lo cual indica que los linfocitos de los pacientes no presentaban una mayor activación que los controles. Estos resultados son similares a los estudios del grupo

de Mary Crow, quienes encontraron un patrón de expresión de CD25 muy parecido en pacientes y controles<sup>62</sup>.

Los resultados obtenidos por los grupos de Datta y Mary Crow además de sugerir una activación policlonal en los linfocitos de los pacientes con LES indican defectos intrínsecos en la expresión de CD40L. Los autores sugieren además que la activación de los linfocitos autoreactivos es perpetuada por interacciones entre linfocitos T-B y linfocitos B-B. Sin embargo nuestros datos no apoyan dichas conclusiones sino que sugieren que la participación de la interacción CD40-CD40L puede ser a nivel de linfocitos T y B antígeno específicos, en donde la expresión de CD40L por linfocitos de pacientes de LES es probable que se encuentre a nivel de órganos linfoides secundarios (bazo, amígdalas, ganglios), que es el lugar donde se lleva a cabo la interacción T-B y activación de linfocitos.

## 10. CONCLUSIONES

- No se encontró expresión de CD40L por linfocitos de sangre periférica de pacientes con LES activo.
- La cinética de expresión inducida de CD40L, bajo diferentes estímulos, fue muy semejante en pacientes y controles.

Por lo anterior, nuestros resultados sugieren que en la mayoría de pacientes con LES, la participación CD40-CD40L en la patogenia de la enfermedad es a nivel de linfocitos T y B autorreactivos en presencia del antígeno.

## APÉNDICE 1

### Criterios para la clasificación de el Lupus Eritematoso Sistémico\* (ref. 63)

Criterios	Definición
1. Erupción malar	Eritema localizado, liso o elevado, por encima de eminencias malares, tendiendo a expandirse a los pliegues nasolabiales.
2. Eritema discoide	Placas eritematosas elevadas con costras queratóticas adherentes y tapamiento folicular; puede ocurrir cicatrización atrófica en lesiones viejas.
3. Fotosensibilidad	Erupciones en piel como resultado de una reacción inusual a la luz solar, por la historia del paciente u observación del médico.
4. Ulceras orales	Ulceras orales o nasofaríngeas, sin dolor. Observadas por un médico.
5. Artritis	Artritis no erosiva que involucra dos o más articulaciones periféricas, caracterizadas por ser frágiles, hinchadas o expansivas.
6. Serositis	a) Pleuritis--historia convincente de dolor pleurítico por un médico o evidencia de efusión pleural. b) Pericarditis--documentada por ECG o evidencias de efusión pericardial
7. Desórdenes renales	a) Persistencia de proteinuria mayor de 0.5g por día o mayor de 3 si la cuantificación no fué hecha. b) Restos celulares-- pueden ser células rojas, hemoglobina, granulares, tubulares o mezcladas.
8. Desórdenes neurológicos	a) Ataques--en ausencia de drogas ofensivas o desórdenes metabólicos conocidos: por ejemplo, uremia cetoacidosis o desbalance electrolítico. b) Psicosis-- en ausencia de drogas ofensivas o desórdenes metabólicos conocidos: por ejemplo, uremia cetoacidosis o desbalance electrolítico.
9. Desórdenes hematológicos	a) Anemia hemolítica--con reticulocitosis. b) Leucopenia--menos de 4000 leucocitos totales por mm <sup>3</sup> en dos o más ocasiones. c) Linfopenia--menos de 1500 linfocitos por mm <sup>3</sup> en dos o más ocasiones. d) Trombocitopenia--menos de 100000 plaquetas por mm <sup>3</sup> en ausencia de drogas ofensivas.
10. Desórdenes inmunológicos	a) Preparación de células LE positiva. b) Anticuerpos Anti-DNA: anticuerpos para DNA nativo en títulos anormales. c) Anticuerpos Anti-Sm: presencia de anticuerpos para el antígeno nuclear Sm. d) Pruebas serológicas falso positivas para sífilis, que se sabe son positivas por lo menos durante seis meses y son confirmadas por pruebas de ELISA para <i>Treponema pallidum</i> .
11. Anticuerpos antinucleares	Títulos anormales de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en algún punto del tiempo y en ausencia de drogas que se sabe están asociadas con el síndrome de "lupus inducido por drogas"

\* La clasificación propuesta está basada en 11 criterios. Para la identificación de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico se considera que el paciente debe reunir 4 o más de los 11 criterios, de manera serial o simultáneamente, durante algún intervalo de la observación.

APÉNDICE 2

ESTA TESIS ESTÁ  
DE LA BIBLIOTECA

SLE-DAI

Fecha \_\_\_\_\_ No. Afiliación \_\_\_\_\_

Nombre del paciente \_\_\_\_\_

(Anotar la calificación SLEDAI durante la revisión o los diez días previos)

Peso	Calif.	Descriptor	Definición
8	_____	Crisis convulsivas	De inicio reciente, excluir causas metabólicas, infecciosas o por drogas.
8	_____	Psicosis	Alteraciones graves en la percepción de la realidad, alucinaciones, incoherencia, asociaciones vagas, alteraciones del pensamiento lógico, conducta anormal. Excluir uremia u otras causas metabólicas.
8	_____	Síndrome orgánico cerebral	Alteraciones de la memoria, orientación u otras funciones intelectuales, de inicio rápido y características clínicas fluctuantes. Trastornos de la atención e incapacidad para concentrarse. Además de dos de los siguientes datos: trastornos perceptivos, lenguaje incoherente, insomnio o somnolencia diurna, aumento o disminución en la actividad psicomotora. Excluir causas metabólicas, por drogas o infecciosas.
8	_____	Trastornos visuales	Cambios retinianos típicos: cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudados serosos o hemorrágicos en la coroides, neuritis óptica. Excluir causas como hipertensión, drogas o infección.
8	_____	Trastornos de pares craneales	Inicio reciente de neuropatía sensitiva o motora en nervios craneales.
8	_____	Cefalea lúpica	Dolor de cabeza persistente y grave, puede ser migrañoso y no responde a analgésicos narcóticos.
8	_____	Accidente cerebrovascular	De reciente aparición, excluir aterosclerosis y hemorragia.
8	_____	Vasculitis	Úlceras, gangrena, nódulos hipersensibles en los dedos, infartos periungueales, hemorragias en astilla, biopsia y angiografía diagnóstica de vasculitis.
4	_____	Artritis	Más de dos articulaciones con dolor y signos de inflamación.
4	_____	Miositis	Dolor o debilidad muscular proximal, con elevación de CK y/o aldolasa, cambios en EMG o biopsia diagnóstica.
4	_____	Cilindros urinarios	Granulosos o eritrocíticos.
4	_____	Hematuria	Más de 5 eritrocitos por campo. Excluir otras causas: litiasis o infección.
4	_____	Proteinuria	Más de 0.5 g de proteínas en 24 horas en relación a la determinación previa.
4	_____	Piuria	Más de 5 leucocitos por campo. Excluir otras causas (infección).
2	_____	Eritema malar	De nueva aparición o recurrencia, inflamatorio, fotosensible.
2	_____	Alopecia	Nueva o recurrente, localizada o difusa.
2	_____	Úlceras mucosas	Nuevas o recurrentes, orales o nasales.
2	_____	Pleuritis	Dolor pleurítico con derrame, frote o engrosamiento pleural.
2	_____	Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes hallazgos: frote, derrame, confirmación ECG o ecocardiografía.
2	_____	Hipocomplementemia	Disminución de C3 a menos de la mitad del límite normal.
2	_____	Anti-DNA	FARR > 25 U/ml.
1	_____	Fiebre	>38°C, excluir infección.
1	_____	Trombocitopenia	< 100,000 plaquetas/mm <sup>3</sup> .
1	_____	Leucopenia	<3000/mm <sup>3</sup> .

Calificación total \_\_\_\_\_

## **11. BIBLIOGRAFÍA**

1. Janeway C. A. and Travers P., Immunobiology, 3a. Edn., Current Biology Limited, USA 1997.
2. Abbas A. K., Lichtman A. H. and Pober J. S., Cellular and molecular immunology, 5a Edn, W. B. Saunders Company, USA 1996.
3. Steward M. W., Small B cell as antigen presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens, Immunol. Today, 2: 134 (1981).
4. Davis M. M. and Bjorkman P. J., T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition, Nature, 334: 395 (1988).
5. Clark E. A. and Ledbetter J. A., How B and T cells talk to each other, Nature, 367: 425-428 (1994).
6. Klein J. And Horejsí V., Immunology, 2a. Edn, Blackwell Science, USA 1997.
7. Moreno J., Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad, Limusa, México 1996.
8. Pulendran B., Kannourakis G., Nouri S., Smith G. C. and Nossal G. J. V., Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cell, Nature, 375: 331-334 (1995).
9. Shokat K. M. and Goodnow C. C., Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses, Nature, 375: 334-338 (1995).
10. Springer T. A., Adhesion receptors of the immune system, Nature, 346: 425 (1990).
11. Tohma S. and Lipsky P. E., The role of CD18a/CD18-CD54 interactions in human T cell-dependent B cell activation, J. Immunol.,



146: 492 (1991).

12. Lanzavecchia A., Antigen-specific interaction between T and B cells, *Nature*, 314: 537-539 (1985).

13. Rock K. L., Benacerraf B., Abbas A. K., Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 160: 1102-1113 (1984).

14. Noelle R. J., Roy M., Shepherd D. M., Stamenkovic I., Ledbetter J. A. and Aruffo A., A 39-Kda protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 6550 (1992).

15. Armitage R. J., et. al., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40, *Nature*, 357: 80 (1992).

16. Grammer A. C., Bergman M. C., Miura Y., Fujita K., Davis L. S. and Lipsky P. E., The CD40 ligand expressed by human B cell responses, *J. Immunol.*, 154: 4996 (1995).

17. Cocks B. G., Chang C. J., Carballido J. M., Yssel H., de Vries J. E. and Aversa G., IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand, *Int. Immunol.*, 5: 657 (1993).

18. Gauchat J. F., Henchoz S., Mazzei G., Aubry J. P., Brunner T., Blasey H., et. al., Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils, *Nature*, 365: 340 (1993).

19. Gauchat J. F., Henchoz S., Fattah D., Mazzei G., Aubry J. P., et. al., CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils, *Eur. J. Immunol.*, 25: 863 (1995).

20. Banchereau J., Bazan F., Blanchard D., Briere F., Galizi J. P., van Kooten C., Liu Y. J., Rousset F., Saeland S., The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 881-922 (1994).

21. Clark E. A., Ledbetter J. A., Activation of human B cells mediated

by two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 4494-4498 (1986).

22. Galy A. H. and Spits H., CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells, J. Immunol., 149: 775 (1992).

23. Karmann K., Hughes C. C., Schechner J., Fanslow W. C. and Pober J. S., CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92: 4342 (1995).

24. Michael J. Y., Vivette D., Glenn P., Angelina S. H. et. al., Immunohistologic analysis of renal CD40 and CD40L expression in lupus nephritis and other glomerulonephritides., Arthritis and Rheumatism, 40: 124-134 (1997).

25. Laman J. D., Claassen E. and Noelle R. J., Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L), Critical Reviews in Immunology, 16: 59-108 (1996).

26. Gordon J., Millsum M.J., Guy G.R., Ledbetter J. A., Resting B lymphocytes can be triggered directly through the Cdw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4 mediated signaling., J. Immunol., 140: 1425-30 (1988).

27. Lane P., Brocker T., Hubele S., Padovan E., Lanzavecchia A., McConnell F. Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cell in T cell-dependent activation. J. Exp. Med. 177:1209-13 (1993).

28. Banchereau J., de Paoli P., Vallé A., Garcia E., Rousset F. Long term human B cell lines dependent on interleukin 4 and anti-CD40. Science 251: 70-72 (1991).

29. Spriggs M. K., Armitage R.J., Strockbine L., Clifford K. N., Macduff B.M., Sato T.A. Maliszewski C.R. and Fanslow W.C. Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. J. Exp. Med. 176:1543-50 (1992).

30. Armitage R.J., Macduff B.M., Spriggs M.K., Fanslow W.C. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J. Immunol.* 150:3671-80 (1993).
31. Rousset F., Garcia E., Banchereau J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J. Exp. Med.* 173: 705-10 (1991).
32. Grabstein K.H., Maliszewski C.R., Shanebeck K., Sato T.A., Sprigg M.K., Fanslow W.C., Armitage R.J., The regulation of T cell-dependent antibody formation in vitro by CD40 ligand and IL-2., *J. Immunol.* 150: 3141-47 (1993).
33. Rousset F., Garcia E., Defrance T., Péronne C., Vezzio N., Hsu D.H., Kastelein R., Moore K.W. Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:1890-93 (1992).
34. Defrance T., Vanbervliet B., Briere F., Durand Y., Rousset F., Banchereau J. Interleukin 10 and Transforming Growth Factor  $\beta$  cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B
35. Arpin C., Dechanet J., Van Kooten C., Merville P., Grouard G., Briere F., Banchereau J. and Liu Y.J. Generation of memory B cells and plasma cells *in vitro*. *Science* 268:720 (1995).
36. DiSanto J.P., Bonnefoy J.Y., Gauchat J.F., Fischer A. and de Saint Basile G. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM, *Nature* 361:541 (1993).
37. Korthäuer U., Graf D., Mages H.W., Briere F., Padayachee M., Malcolm S., Ugazio A.G., Notarangelo L.D., Levinsky R.J. and Kroczeck R.A., Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM, *Nature* 361:539 (1993).
38. Foy T.M., Laman J.D., Ledbetter J.A., Aruffo A., Claassen E. and Noelle R.J., gp39-CD40 interactions are essential for germinal center

formation and the development of B cell memory., J. Exp. Med., 180:157 (1994).

39. Xu J., Foy T.M., Laman J.D., Elliott E.A., Dunn J.J., Waldschmidt T.J., Elsemore J., Noelle R.J. and Flavell R.A., Mice deficient for the CD40 ligand, Immunity 1:423 (1994).

40. Castigli E., Alt F.W., Davidson L., Bottaro A., Mizoguchi E., Bhan A.K. and Geha R.S., CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation Proc. Natl. Acad. Sci. S.A., 91:12135 (1994).

41. Parry S.L., Hasbold J., Holman M. and Klaus G.G.B., Hypercross-linking surface IgM or IgD receptors on mature B cells induces apoptosis that is reversed by costimulation with IL-4 and anti-CD40, J. Immunol., 152:2821 (1994).

42. Finkelman F.D., Holmes J.M., Dukhanina O.I. and Morris S.C., Cross-linking of membrane immunoglobulin D, in the absence of T cells help, kills mature B cells *in vivo*, J. Exp. Med., 181:515 (1995).

43. Liu Y.J., Joshua D.E., Williams G.T., Smith C.A., Gordon J. and MacLennan I.C.M., Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres, Nature, 342:929 (1989).

44. Lomo J., Blomhoff H.K., Beiske K., Stokke T. and Smeland E.B., TGF- $\beta$ 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes, J. Immunol., 154:1634 (1995).

45. Cherney B.W., Bhatia K. and Tosato G., A role for deregulated c-Myc expression in apoptosis of Epstein-Barr virus-immortalized B cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:12967 (1994).

46. Tsubata T., Wu J. and Honjo T., B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40, Nature, 364:645 (1993).

47. Lane P., Common variable immunodeficiency: does life begin at

40? Clin. Exp. Immunol., 95:201 (1994).

48. Ruby J., Bluethmann H., Aguet M. and Ramshaw I.A., CD40 ligand has potent antiviral activity, *Natural Medicine*, 1:437-441 (1995).

49. Goodnow C.C., Adelstein S., Basten A., The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire, *Science*, 248:1373-79 (1990).

50. Parijs L.V. and Abbas A.K., Homeostasis and Self-Tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off, *Nature*, 280:243-48 (1998).

51. Kotzin B.L., Systemic Lupus Erythematosus, *Cell*, 85: 303-306 (1996).

52. Datta S.K., Patel H. and Berry D., Induction of a cationic shift in IgG anti-DNA autoantibodies. Role of T helper cell with classical and novel phenotypes in three murine models of lupus nephritis, *J. Exp. Med.*, 165:1252-1268 (1987).

53. Mohan C., Adams S., Stanik V. and Datta S.K., Nucleosome: a mayor immunogen for the pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus, *J. Exp. Med.* 177: 1367 (1993).

54. Gavalchin J., Nicklas J., Eastcott J.W., Madaio M.P., Stollar B.D., Schwartz R.S. and Datta S.K., Lupus prone (SWR x NZB)F<sub>1</sub> mice produce potentially nephritogenic autoantobodies inherited from the normal SWR parent, *J. Immunol.*, 134: 885-894 (1985).

55. Mohan C., Shi Y., Laman J.D. and Datta S.K., Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis, *J. Immunol.*, 154: 1470-1480 (1995).

56. Early G.S., Zhao W. and Burns C.M. Anti-CD40 ligand antibody treatment prevents the development of lupus-like nephritis in a subset of New Zealand Black x New Zealand White Mice. *J. Immunol.*, 157:3159-3164.

57. Ma J., Xu J., Madaio M.P., Peng Q., Zhang J., Grewal I.S., Flavell R.A. and Craft J., Autoimmune *lpr/lpr* mice deficient in CD40 ligand, *J. Immunol.*, 157:417-426 (1996).
58. Blossom S., Chu E.B., Weigle W.O. and Gilbert K. M., CD40 ligand expressed on B cells in the BXSB mouse model of systemic lupus erythematosus, *J. Immunol.*, 159: 4580-4586 (1997).
59. Rajagopalan S., Zordan T., Tokos G.C. and Datta S.K., Pathogenic anti-DNA autoantibody inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: Isolation of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> T helper cell lines that express the  $\gamma/\delta$  T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:7020-7024 (1990).
60. Desai-Mehta A., Mao C., Rajagopalan S., Robinson T., Datta S.K., Structure and specificity of T-cell receptors expressed by pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T cells in human lupus, *J. Clin. Invest.*, 95:531-541 (1995).
61. Desai-Mehta A., Lu L., Ramsey-Goldman R. and Datta S.K., Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production, *J. Clin. Invest.*, 97:2063-2073 (1996).
62. Koshy M., Berger D. And Crow M.K., Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes, *J. Clin. Invest.*, 98:826-837 (1996).
63. Tan M., Cohen S., Fries J., Masi T., Mc Shane J., et. al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheum.*, 25:1271 (1982).
64. Bombardier C., Gladman D., Urowitz D. and Chang C. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* 35:360 (1992).
65. FACScan User's Guide, Lysys II Software User's Guide, Becton Dickinson, San José, Cal. (1992).

66. Yellin M.J., K. Sippel, G. Inghirami, L.R. Covey, J.J. Lee, J. Sinning, E.A. Clark, L. Chess, and S. Lederman. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40L. *J. Immunol.* 152:598-608 (1994).
67. Marsh M. and Pelchen-Matthews A. Endocytic and exocytic regulation of CD4 expression and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 205:107-135 (1996).