

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACION,
REGULACION Y FUNCIONALIDAD
DE LA EXPRESION DE CD69 EN LA
ARTRITIS REUMATOIDE**

Realizada por:

César Henández García

Directores:

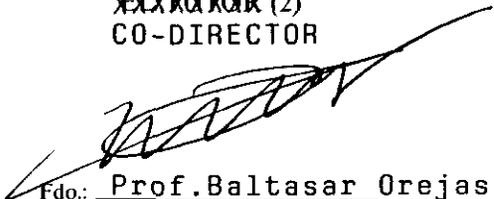
Dr. Juan Angel Jover Jover

Prof. Baltasar Orejas González

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Una vez leído el texto propuesto por el doctorando, considero que reúne todas las condiciones necesarias en cuanto fondo y forma para ser defendido como proyecto de Tesis Doctoral.

V.º B.º
~~XXXXXXXXXX~~ (2)
CO-DIRECTOR


Fdo.: Prof. Baltasar Orejas
(fecha y firma)

D.N.I.: 11.017.528

El Director de la Tesis


Fdo.: Dr. Jover Jover
(fecha y firma)

D.N.I.: 5.340.535

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

PROFESOR D. RAFAEL ENRIQUEZ DE SALAMANCA LORENTE, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORMA: que una vez examinado el Trabajo presentado por D. CESAR HERNANDEZ GARCIA, titulado: "CARACTERIZACION, REGULACION Y FUNCIONALIDAD DE LA EXPRESION DE CD69 EN LA ARTRITIS REUMATOIDE", dirigido por el Prof. Dr. Baltasar Orejas González y D. Juan Angel Jover Jover, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

15-12-1995



Director del Departamento


Fdo.: PROF. R. ENRÍQUEZ DE SALAMANCA
(fecha y firma)

2-2-1996

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Angel Jover, por su amistad, apoyo y enseñanzas, y en reconocimiento a que mi trabajo como residente, becario y facultativo especialista nunca habría podido ser igual sin él.

Al Prof. Baltasar Orejas González, director también de esta tesis, por su labor desinteresada, pero sobre todo por haberme enseñado a ser médico. No quiero olvidar tampoco al Prof. Angel Ruiz de Aguiar González. Para ambos mi más sincera y profunda admiración, y mi agradecimiento también para el resto de miembros del Servicio de Medicina Interna IV del Hospital Universitario San Carlos, con quienes comencé mi camino en la medicina.

A mis amigos y compañeros en el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario San Carlos. Al Dr. Antonio Bañares Cañizares, mi amigo, al Dr. Benjamín Fernández Gutiérrez, a la Dra. Paula Ramos Nuñez, a la Dra. Concha Morado Quiñoá y a la Dra. Paz Collado Ramos. Con todos ellos he compartido malos y buenos ratos, una gran ilusión, y una gran amistad.

A los Dres. José Antonio Serra Rexach y Maite Vidán Astiz, compañeros en el laboratorio y amigos dentro y fuera de él.

A los residentes del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario San Carlos, Dres. Godoy Ochoa, Candelas Rodríguez y Blanco Hontiyuelo, por su paciencia conmigo y su ayuda a la hora de reclutar pacientes para este estudio.

A Lola Olmos Gómez y Ana López Benito, así como al resto de personal del Servicio de Reumatología, por su ayuda logística.

Finalmente, al Dr. Emilio Gómez de la Concha, la Dra. Figueredo y el resto de miembros del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario San Carlos por haberme acogido desinteresadamente a lo largo del desarrollo de este trabajo.

*A Concha
A Sergio y César
A mis padres y hermanos*

INDICE

I. ABREVIATURAS.

II. INTRODUCCION.

III. OBJETIVOS Y PRESENTACION DEL TRABAJO.

IV. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.

IV.a. El sistema inmune.

1. Activación de los linfocitos T.

1.1 Reconocimiento del Ag y otras interacciones.

1.2 Señales transmembrana.

1.3 Activación genética y síntesis de DNA.

IV.b. Patogenia de la artritis reumatoide.

1. Susceptibilidad al desarrollo de la AR.

2. Agentes exógenos y AR.

3. Inmunoregulación en la AR.

3.1 Papel de los linfocitos T en la AR.

3.2 Análisis fenotípico de los linfocitos T en AR.

3.3 Análisis funcional de los linfocitos T de AR.

3.4 Mecanismos de migración linfocitaria en AR.

3.5 El papel de otras células en la AR.

3.6 Destrucción articular en la AR.

IV.c. La molécula CD69.

1. Descripción del CD69.

2. Estructura molecular del CD69.

3. Células que expresan CD69.

4. Regulación de la expresión de CD69.

5. Acciones biológicas del CD69.

V. MATERIAL Y METODOS.

1. Pacientes.

2. Preparación de las células.

3. Análisis del fenotipo.
4. Ensayo de mantenimiento del CD69.
5. Ensayos de proliferación.
6. Cinética de la expresión de CD25.
7. Producción de IL-2.
8. Análisis estadístico.

VI. RESULTADOS.

1. Expresión de CD69 en el LS.
2. Expresión de otros marcadores celulares en LS y SP.
3. Fenotipo de las células CD69+ presentes en el LS.
4. Regulación de la expresión de CD69 en las células T de LS.
5. Mecanismo de mantenimiento de la expresión de CD69.
6. Inducción de CD69 en linfocitos T de SP.
7. Funcionalidad vía CD69 de los linfocitos T de LS.
8. Expresión de CD25 tras estímulo vía CD69.
9. Producción de IL-2 tras estímulo vía CD69.
10. Proliferación de los linfocitos T de LS CD69+ y CD69-.
11. Proliferación de los linfocitos T de LS tras cultivo.

VII. DISCUSION.

1. Estudio fenotípico.
2. Regulación de la expresión de CD69.
3. Funcionalidad de la molécula CD69.

VIII. CONCLUSIONES.

IX. REFERENCIAS.

I. ABREVIATURAS

A

AcM = anticuerpos monoclonales.
Ag = antígeno.
AIM = molécula inductora de activación (=CD69).
AR = artritis reumatoide.

B

BSA = albúmina bovina sérica.

C

[Ca²⁺]_{ic} = concentración de calcio intracelular.
CD = células dendríticas.
CMH = complejo mayor de histocompatibilidad.
CPA = células presentadoras de antígeno.
cpm = cuentas por minuto.

D

DAG = diacilglicerol.
DE = desviación estándar.

F

FR = factor reumatoide.

H

[³H]TdR = timidina tritiada.

I

IFM = intensidad de fluorescencia media.
IFN γ = interferón gamma.
IgS = inmunoglobulina de superficie.
IL = interleuquina.
IL-2 = interleuquina-2.
IL-2R = receptor de interleuquina-2.
IP₃ = inositol trifosfato.

L

LES = lupus eritematoso sistémico.
LLS = linfocitos de líquido sinovial.
LS = líquido sinovial.
LSP = linfocitos de sangre periférica.

M

MFC = medio final de cultivo.
MS = membrana sinovial.

N

N-HC = hematíes de carnero tratados con neuraminidasa.
NK = natural killer.

P

PBS = suero salino tamponado con fosfato.
PF = paraformaldehído.
PHA = fitohemaglutinina.
PKC = proteína-kinasa C.
PLA₂ = fosfolipasa A.
PLC = fosfolipasa C.
PMA = forbol miristato acetato.

R

ReT = receptor de antígeno de la célula T
rIL-2 = interleuquina-2 recombinante.

S

SP = sangre periférica.
STF = suero de ternera fetal.

T

TNF = factor de necrosis tumoral.

II. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica que puede afectar cualquier articulación. Sus manifestaciones básicas son el dolor, la inflamación, la deformación y la limitación funcional. La incidencia anual es de tres nuevos casos por cada 10.000 sujetos, con una prevalencia de un 1% de la población ⁽¹⁾. Es una enfermedad con extensión universal, que afecta más frecuentemente a la población femenina (con una incidencia 3:1). Hasta el momento no se dispone de un tratamiento efectivo por lo que, a pesar de los esfuerzos encaminados a desarrollar nuevas terapias, la enfermedad sigue un curso variable que finalmente determina la destrucción articular.

El impacto global que la enfermedad tiene sobre la salud de un paciente individual puede medirse en cinco dimensiones. Por un lado los pacientes con AR sufren de incapacidad progresiva que aumenta de un modo prácticamente indefectible desde el comienzo de la misma. Esta incapacidad se acompaña de un grado variable de dolor y/o molestia, y en ocasiones de muerte prematura. El uso de medicaciones agresivas hace que el número de complicaciones iatrogénicas sea también alto. Y por último, pero no menos importante, la cronicidad de la AR tiene un impacto económico y social sobre la vida del paciente difícil de cuantificar pero inexorable en el curso natural de la enfermedad ⁽²⁾. Se ha valorado que el coste global de la enfermedad para cada paciente individual y la sociedad es tan alto como el que suponen la enfermedad cerebrovascular o la enfermedad coronaria ⁽¹⁾.

No se conoce con seguridad cuál es la etiología de la AR y los mecanismos que están implicados en su patogenia. Ello a pesar de que los trabajos de investigación sobre la etiopatogenia de esta enfermedad son abundantísimos en la literatura médica. Parece claro que una disregulación del sistema inmune juega un papel primordial en el desarrollo de la enfermedad. Existe una predisposición genética a padecerla que viene dada por determinados alelos de las moléculas clase II del complejo mayor de

histocompatibilidad, en concreto DR4 y DR1. La secuencia que determina esta susceptibilidad se sitúa en la 3ª región hipervariable del gen DRB1 y es compartida por algunos subtipos de DR4 y DR1. Sobre esta predisposición genética actuaría hipotéticamente un agente exógeno (posiblemente viral o bacteriano), provocando una disregulación del sistema inmune que finalmente determinaría la afectación articular. De hecho la mayoría de los nuevos tratamientos que se vienen experimentando van dirigidos de uno u otro modo a corregir en la medida de lo posible este mal funcionamiento del sistema inmune. Sin embargo el descubrimiento de un tratamiento ideal, ya sea en las primeras fases del desarrollo de una AR como en la fase de cronicidad, es difícil por varios motivos. En primer lugar se desconoce el papel relativo que cada una de las células del sistema inmune juega en la enfermedad. Por otro lado el número de moléculas que regulan el funcionamiento de estas células es muy amplio y se ignora cual es la actuación de cada una de ellas en el caso concreto de la AR. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos que finalmente llevan a la destrucción articular en esta enfermedad no es sólo un ejercicio teórico sino que puede tener grandes implicaciones en el tratamiento.

La AR se caracteriza por la presencia en el tejido y líquido sinovial (LS) de un prominente infiltrado de células mononucleares compuesto principalmente de linfocitos T activados. Las células T de la membrana y el LS expresan de forma constante diferentes antígenos de activación y diferenciación como HLA-DR, CD45RO y varias integrinas β_1 (VLA-1, VLA-4) y β_2 (LFA-1). Sin embargo otros antígenos de activación como el receptor de interleuquina-2 (IL-2R α) o el receptor de transferrina (CD72) se expresan en porcentaje e intensidad menores que las que cabría esperar en células T activadas. Los estudios de funcionalidad han demostrado además una baja producción de citoquinas derivadas de células T como IL-2 o interferón- γ (IFN- γ) y una tasa de proliferación disminuida en respuesta a varios mitógenos y antígenos. Todas estas discrepancias han promovido un debate sobre la verdadera importancia de las células T en la iniciación y el

mantenimiento de la enfermedad (3,4).

La reciente observación de que los linfocitos T de membrana y LS de AR expresan en una alta proporción CD69 ha contribuido a perfilar un estado de activación poco frecuente en estas células. Este estado de activación, de alguna forma paradójico, se caracteriza por una alta expresión de antígenos de activación inmediatos (CD69) y tardíos (HLA-DR, CD45RO) pero una expresión normal de otros antígenos de activación intermedios (CD25, CD71).

CD69 es una molécula perteneciente a la superfamilia de las lectinas animales tipo-C. Es el antígeno inducible que más temprano aparece tras la activación de los linfocitos T con una amplia variedad de estímulos. La regulación de la expresión de CD69 es especialmente interesante. CD69 no se detecta en linfocitos T de sangre periférica (SP) en reposo y aparece tan sólo 30-60 minutos después de su estímulo. El pico de expresión se alcanza a las 24 horas y entonces va desapareciendo gradualmente hasta que aproximadamente a las 74 horas ya no es detectable en la superficie celular. La regulación a nivel genético es aún más rápida y, como ocurre con otros genes considerados inmediatos, el gen del CD69 tiene una rápida y transitoria expresión que se sigue de una degradación prácticamente instantánea a nivel del ARNm. Una vez que CD69 es expresado en respuesta a dosis submitogénicas de ésteres de forbol, los anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra la molécula son capaces de desencadenar la proliferación celular. No se conoce el ligando fisiológico de CD69.

El hecho de que las células T presentes en la sinovial de pacientes con AR hiperexpresen CD69, junto con su regulación característica en comparación con otros antígenos de activación, proporciona una nueva forma de abordar el problema de la activación y función de las células T en la AR que puede facilitar un mayor conocimiento de la patogenia de la enfermedad.

III. PRESENTACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la patogenia de la artritis reumatoide y, en particular, en el estado de activación linfocitaria T en el líquido sinovial y sangre periférica de estos pacientes, hemos analizado la expresión, regulación y funcionalidad de un marcador de activación precoz como es CD69 en las células T de pacientes con artritis reumatoide.

Los objetivos concretos del trabajo fueron los siguientes:

1. Definir el fenotipo de las células T de líquido sinovial que expresan CD69.
2. Estudiar los mecanismos que regulan su alta expresión en las células T de líquido sinovial en esta enfermedad.
3. Analizar la funcionalidad de esta vía de activación celular en la artritis reumatoide.

Para ello vamos a presentar en una primera parte una revisión amplia y actualizada del problema que incluye los apartados siguientes: (a) el sistema inmune, (b) etiopatogenia de la AR y (c) la molécula CD69.

En la segunda parte, que constituye la exposición del trabajo de tesis propiamente dicho, se describe la metodología utilizada, los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. Por último se presentan las conclusiones del trabajo.

IV. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La función primaria del sistema inmune es la eliminación de moléculas extrañas y de los organismos vivos que las poseen. Este funcionamiento se asienta sobre cuatro pilares fundamentales que son: (a) la especificidad de respuesta frente a un extenso número de antígenos (Ag); (b) la capacidad de promover una respuesta frente a un determinado Ag durante el primer encuentro con él; (c) la capacidad de memoria, de tal modo que después de un primer encuentro con un Ag es capaz de iniciar una respuesta rápida y vigorosa durante un segundo encuentro con el mismo; y (d) la capacidad de discernir entre lo propio y lo extraño. Para cumplir esta última característica, el sistema inmune ha desarrollado lo que se conoce como mecanismos de tolerancia que hacen que no responda frente a autoantígenos. Puesto que cada linfocito está preparado para reconocer un Ag determinado, todo lo que es necesario para producir tolerancia frente a los autoantígenos es anular funcionalmente aquellas células capaces de responder potencialmente frente a los componentes normales del propio organismo.

En algunos casos en los que se rompen los mecanismos de auto-tolerancia inmunológica se producen las llamadas enfermedades autoinmunes. El espectro de estas enfermedades es muy amplio y abarca desde aquellas que se manifiestan como órgano-específicas (es decir, la respuesta inmune anormal va dirigida contra un órgano específico del cuerpo) hasta las no órgano-específicas (en las que la producción de autoanticuerpos y las lesiones destructivas se distribuyen por varios órganos). En el extremo de la no órgano-especificidad se agrupan la mayor parte de las enfermedades reumatológicas. Aún dentro de ellas existe gran variabilidad y superposición en cuanto a sus manifestaciones clínicas y su relativa órgano-especificidad. Así, el paradigma de enfermedad no órgano-específica es el lupus eritematoso sistémico (LES), en el cual las lesiones aparecen ampliamente diseminadas. Por el contrario, la AR es una enfermedad en la que, aun pudiendo afectar en un determinado número de enfermos gran variedad de órganos del cuerpo, se caracteriza fundamentalmente por la existencia de inflamación articular de

carácter crónico y un comportamiento invasivo, casi tumoral, que determina finalmente la destrucción de las estructuras que componen la articulación normal ⁽⁵⁾.

El estudio fisiopatológico de la AR puede dividirse en tres fases: iniciación, destrucción y autoperpetuación ⁽⁶⁾. La fase de iniciación implica la acción de un hipotético agente desencadenante (virus, bacteria, productos de la pared bacteriana) sobre un sujeto genéticamente predispuesto. La fase de destrucción y la de autoperpetuación son más difíciles de separar tanto temporalmente como en sus mediadores.

Independientemente del motivo de su comienzo, la consecuencia final de la AR en las articulaciones es una pérdida de la arquitectura normal de la membrana sinovial (figura IV.1), con hiperplasia de sinoviocitos tanto tipo A

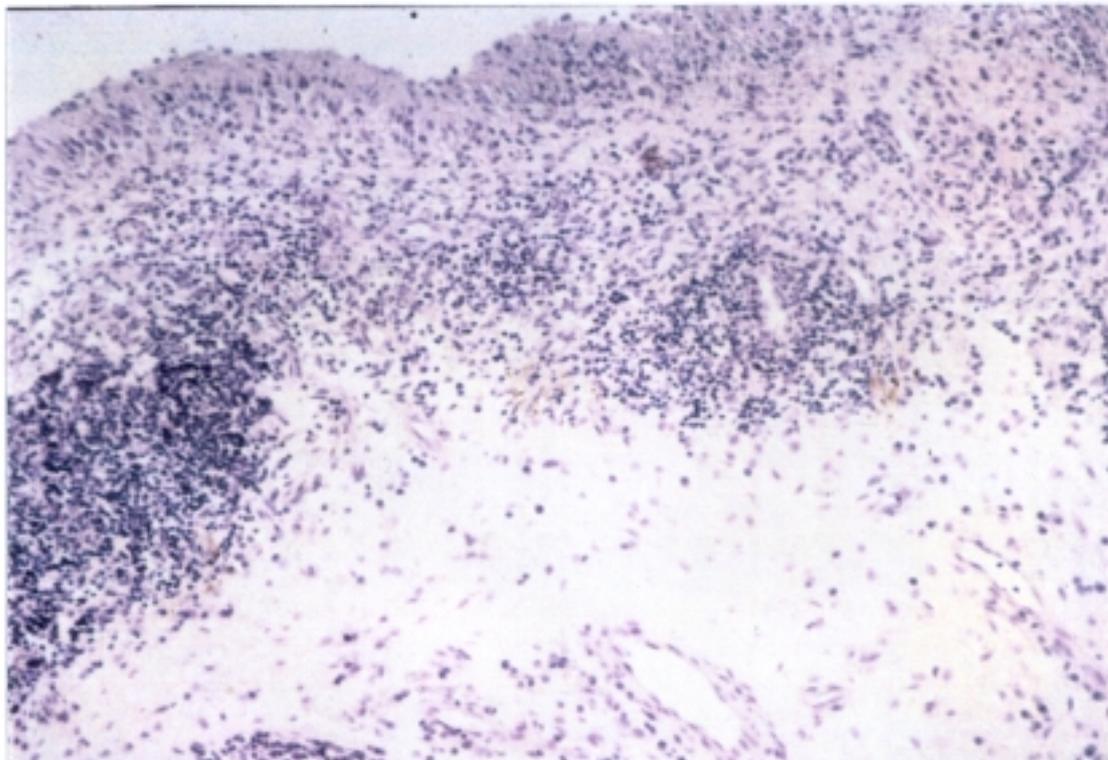


Figura IV.1. Membrana sinovial de un paciente con artritis reumatoide. El recubrimiento celular (lining) es hiperplásico, formado por varias capas de sinoviocitos tipo I y II. Se observan linfocitos formando nódulos alrededor de las venas y extendiéndose difusamente por toda la región sinovial profunda. Existe una importante formación de neovasos. (Hematoxilina-eosina, x200)

(células tipo macrófago, con marcadores en superficie como moléculas clase II y receptores para Fc) como tipo B (células de tipo fibroblástico secretoras, con un retículo endoplásmico rugoso prominente y gran número de ribosomas), proliferación de fibroblastos y formación de nuevos vasos. Existe también de forma característica un acúmulo de linfocitos, células plasmáticas y células de estirpe macrófaga. Las primeras tienden a formar verdaderos folículos linfoides y en su mayoría son células T con fenotipo CD4 y marcadores de activación, aunque también hay células T CD8+ y células B⁽⁷⁾. El elemento con mayor capacidad destructiva para la articulación es el *pannus*, un tejido de granulación compuesto por fibroblastos, gran número de nuevos vasos y diferentes células inflamatorias. La gran hiperplasia celular de este tejido y su comportamiento invasivo forman parte de las características que hacen de la AR una enfermedad con gran potencial destructivo a nivel local.

A continuación se revisarán algunos aspectos fundamentales del funcionamiento normal del sistema inmune, el estado actual de los conocimientos acerca de la patogenia de la AR, y finalmente el interés que la molécula de activación CD69 tiene en el estudio de la AR y otras enfermedades autoinmunes.

IV. a. El sistema inmune

De todas las células que forman parte del sistema inmune solamente dos tienen receptores para Ag en su superficie y juegan por tanto un papel esencial en la especificidad de la respuesta inmunológica. Son los linfocitos B (derivados de la médula ósea) y los linfocitos T (derivados del timo). Ambas células se comportan de modo muy distinto: tienen diferentes receptores específicos de Ag en su superficie, reconocen Ag de distinta naturaleza por mecanismos también diferentes, y, por último, sus respuestas a tales Ag son también características y propias.

Existen diferentes tipos de células T que tienen también una diversidad

de funciones. De un modo amplio se pueden reconocer dos tipos de linfocitos T. Por un lado aquellos que colaboran con las células B y macrófagos/monocitos ayudándoles a desarrollar sus funciones que son conocidos como linfocitos T "cooperadores", y por otro aquellos que tienen funciones específicas de lisis de células infectadas por virus u otros patógenos intracelulares conocidos como linfocitos T "citotóxicos". Todas las células T maduras se reconocen porque presentan una serie de marcadores de diferenciación en su superficie. Entre ellos destaca el receptor de Ag de la célula T (RcT) ⁽⁸⁾. La gran mayoría de células T de SP (>90%) expresan un receptor formado por las cadenas α y β (RcT- $\alpha\beta$), pero una minoría (<10%) expresan un receptor formado por dos cadenas distintas denominadas γ y δ (RcT- $\gamma\delta$). Todas las células T expresan además las moléculas CD3, CD2, CD5 y CD7. Sin embargo las moléculas CD4 y CD8 definen recíprocamente diferentes subtipos funcionales de células T ⁽⁹⁾. Aquellas con RcT- $\alpha\beta$ /CD4⁺ son en su mayoría células "cooperadoras", mientras que aquellas con RcT- $\alpha\beta$ /CD8⁺ son en su mayor parte células "citotóxicas". Por otro lado las células con RcT- $\gamma\delta$ suelen ser bien CD8⁺ o CD4⁻/CD8⁻, y están involucradas mayoritariamente en fenómenos de citotoxicidad. La expresión de la isoforma de bajo peso molecular del CD45 (CD45RO) delimita también un subgrupo de células dentro de la población CD4⁺ conocidas como células "memoria" por cuanto se supone que serían células que ya han tenido un primer encuentro con el Ag para el que son específicas. De forma alternativa, las células CD4⁺ que expresan la isoforma del CD45 de alto peso molecular (CD45RA) son conocidas como células "vírgenes" ⁽¹⁰⁾.

I. Activación de los linfocitos T.

La activación de la célula T comprende una serie de eventos que comienzan con el reconocimiento del Ag para el que es específica, la transmisión de una serie de señales a través de la membrana celular, y por último la activación y transcripción de una serie de genes que finalmente determinan la entrada de la célula en ciclo celular y su proliferación. Durante este proceso se produce la activación secuencial de más de 70 genes que se

traducen en la regulación (ya sea activación o represión) del mismo número de moléculas en la célula. Todo ello da idea de la complejidad global de un sistema que finalmente es responsable del desarrollo de funciones tan importantes como la citotoxicidad, la ayuda a células B para la producción de anticuerpos o el control de la activación de monocitos y macrófagos.

1.1 Reconocimiento del antígeno y otras interacciones.

Los linfocitos T reconocen el Ag en la superficie de células presentadoras de Ag especializadas (CPA) a través de su receptor específico en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I o clase II. El ReT es un heterodímero en el cual la porción que liga el Ag es única para cada clon de células T. Ambas cadenas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, tienen una única región transmembrana y una corta cola intracitoplásmica. El ReT está siempre ligado covalentemente con el complejo CD3, una serie de cadenas polipeptídicas que se expresan invariablemente en todas las células T. Mientras el ReT reconoce el Ag, es el complejo CD3 el encargado de transmitir la señal de activación a través de la membrana. En condiciones experimentales es posible obtener una activación de las células T mediante el uso de AcM dirigidos contra el complejo CD3, y esta activación es óptima cuando existe un entrecruzamiento de los AcM por sus porciones Fc por otras células (lo que se consigue con la presencia de monocitos en el cultivo) o mediante la adhesión de estos AcM a plástico o macromoléculas. Ello facilita una activación policlonal no antígeno-específica de los linfocitos T⁽¹¹⁾.

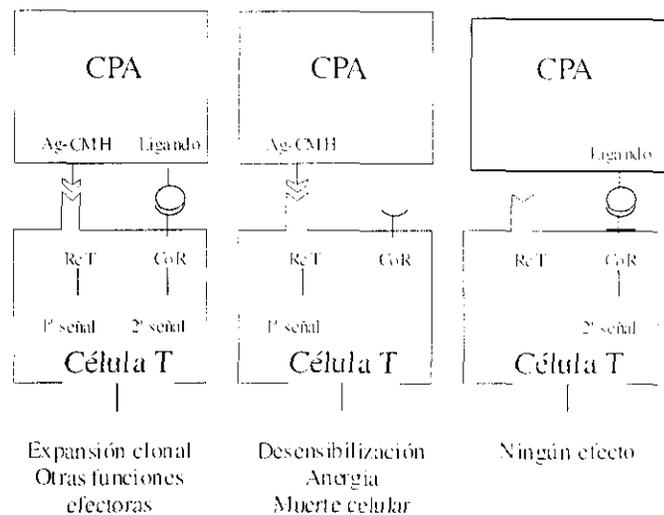
El encuentro con el Ag específico es una condición necesaria pero no suficiente para la activación de la célula T. Este debe ser presentado unido a moléculas del CMH adecuadas en la superficie de las CPA. Un mayor grado de restricción viene dado por el hecho de que las células T CD4⁺ reconocen Ag en el contexto de moléculas clase II, mientras que las células T CD8⁺ lo hacen en el contexto de moléculas clase I. De hecho, existe una interacción

física directa entre las moléculas CD4 y CD8 y las regiones no polimórficas de los dominios $\alpha 3$ de sus respectivas moléculas clase II y clase I. Este hecho tiene importantes implicaciones en el mecanismo de transmisión de la señal al interior de la célula, ya que asocia por proximidad una proteína-tirosina-quinasa específica (p56^{lck}) ligada a CD4 ó CD8 con el complejo CD3. Hay que resaltar sin embargo, que la transmisión de señales al interior de la célula vía CD4 ó CD8 (y por lo tanto vía p56^{lck}) puede ocurrir sin necesidad de encontrarse asociados al complejo CD3 ⁽¹¹⁾.

Aunque la formación del complejo trimolecular (RcT-Ag-CMH) es crítica en el inicio del proceso de activación celular, es necesaria la interacción de otras moléculas presentes en la superficie de la célula T con sus ligandos específicos en las CPA para que la activación sea completa y efectiva: son las llamadas señales coestimuladoras ⁽¹²⁾. De hecho, la interacción del complejo RcT/CD3 con un Ag en el contexto apropiado de moléculas del CMH pero en ausencia de estas señales coestimuladoras desencadena un estado de anergia antígeno-específica durante un tiempo o incluso la delección clonal de los linfocitos con ese determinado RcT. De ello se deduce que la señal dada por la activación del complejo RcT/CD3 en los casos en los que no va acompañada de otro tipo de señales es capaz de transmitir un mensaje negativo al interior que resulta en este estado de incapacidad para proliferar en respuesta a los estímulos. En base a esto, se ha desarrollado un modelo de activación linfocitaria mediante dos señales (figura IV.2).

De todas las moléculas conocidas hasta este momento, la vía de coestimulación CD28/B7 es la más importante y la más estudiada. CD28 es una glicoproteína homodimérica compuesta por dos subunidades de 44 kD unidas por puentes disulfuro. Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas ⁽¹³⁾. La mayoría de las células CD4⁺ expresan CD28 en su superficie, mientras sólo la mitad de las CD8⁺ lo hacen. También lo expresan la mayoría de los linfocitos T con RcT- $\gamma\delta$. Se han identificado varios ligandos naturales de CD28 que son llamados B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) y B7-3. La molécula B7-1 no se expresa de forma constitutiva en CPA (a excepción de

Figura IV.2. Modelo de interacción entre las células T y las células presentadoras de antígeno (CPA). Cada CPA expresa el antígeno (Ag) junto al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y/o ligandos de la familia B7. El encuentro con una célula T que expresa el receptor de antígeno (RcT) específico y los co-receptores (CoR) de B7, CD28 o CTLA-4 puede dar como resultado (a) la expansión clonal de la célula T, (b) un estado anérgico o la apoptosis de la célula, y (c) ningún efecto, dependiendo de la combinación de señales proporcionada por la CPA.



las células dendríticas), pero aparece en células B tras su activación mediante el entrecruzamiento con Ac de las inmunoglobulinas de superficie o de las moléculas clase II (14,15), en macrófagos tras la activación con IFN- γ (15) y también en linfocitos T activados. B7-2 se expresa en niveles muy bajos en células B en reposo y se regula rápidamente al alza tras su activación, con una cinética que difiere substancialmente de la de B7-1.

El efecto funcional de la estimulación con AcM anti-CD28 en células T humanas es similar a las funciones coestimuladoras que proveen las células accesorias. En otras palabras, AcM dirigidos contra la molécula CD28 sinergizan con una amplia variedad de estímulos subóptimos como AcM anti-RcT/CD3, anti-CD2, lectinas o ésteres de forbol, y proporcionan una óptima producción de citoquinas por parte de las células T así como su entrada en ciclo y proliferación (14,16-18). Junto con esto, la estimulación vía CD28 con AcM es capaz de prevenir la inducción de anergia en clones celulares T Ag-específicos cuando son estimulados con Ag y CPA fijadas (19). Como se comentará más adelante, el estímulo a través de CD28 desencadena una serie de fenómenos intracelulares que son distintos a los desencadenados por la activación vía RcT/CD3 y que sinergizan con ellos para obtener una óptima y completa funcionalidad en la célula T. Se ha descrito también la existencia de otra glicoproteína denominada CTLA-4 (una abreviatura de *cytolytic T-*

lymphocyte-associated antigen) de una gran homología con CD28 que es capaz de ligar con gran avidéz B7-1 y sobre todo B7-2. Sin embargo, y a diferencia de CD28, CTLA-4 no se expresa constitutivamente en células T apareciendo solamente tras su activación.

Además de CD28/B7 y CTLA-4/B7 pueden existir otras moléculas coestimuladoras. Se ha descrito un antígeno estable al calor, reconocido en linfocitos T murinos por el AcM J11d que tiene también propiedades coestimuladora. Las CPA expresan en su superficie otras moléculas (figura IV.3) que ligan receptores en la superficie de la célula T participando en la adhesión de ambos tipos celulares durante su activación. La mayoría de estas moléculas no sólo participan en mecanismos de adhesión más o menos inespecíficos sino que también son capaces de generar señales de activación al interior de la célula T ⁽¹¹⁾. Es probable por lo tanto que las células T reciban múltiples señales de activación provenientes de el acoplamiento de todas estas moléculas con sus ligandos específicos en la CPA y que la suma de todas estas señales (con mayor o menor jerarquía) sea la que determine finalmente el

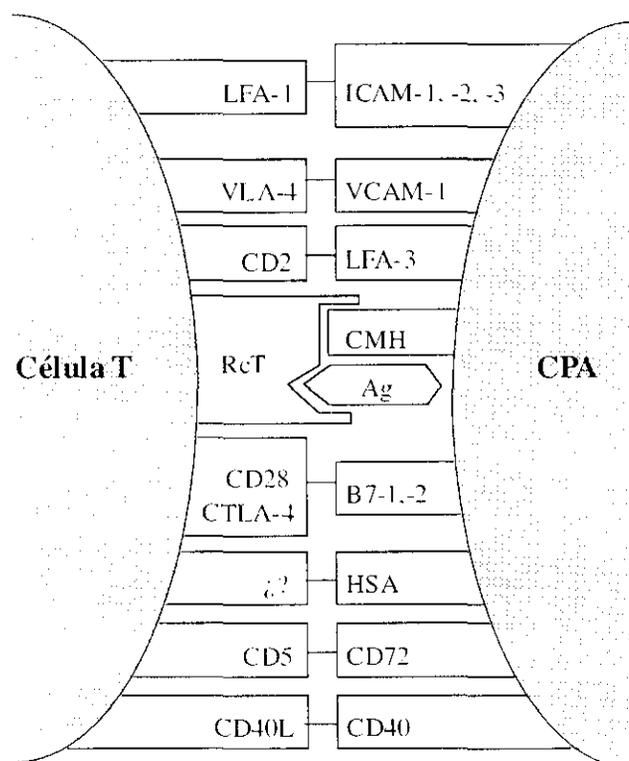


Figura IV.3. Interacción entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno. En esta figura se muestran esquemáticamente algunas de las moléculas que participan en las interacciones entre células T y células presentadoras de Ag.

estado funcional de la célula T.

1.2 Señales transmembrana.

Una vez que se produce el reconocimiento antigénico y las interacciones celulares comentadas más arriba, la señal activadora debe trasladarse al interior de la célula. En este paso juegan un papel fundamental la fosforilación y defosforilación de una serie de proteínas (figura IV.4). El primer hecho bioquímico que se produce tras la interacción del Ag-CMH con el complejo ReT/CD3, antes incluso de la activación de la fosfolipasa C (PLC), es la fosforilación de una serie de proteínas en sus residuos de tirosina a través de diferentes tirosina-kinasas ⁽²⁰⁾. Como se ha referido anteriormente, las moléculas CD4 y CD8 tienen asociadas en sus porciones intracitoplásmicas una tirosina-kinasa denominada p56^{lck}. Como resultado de la asociación física entre CD4 ó CD8 y el complejo ReT/CD3 que se produce tras la activación, la p56^{lck} queda en proximidad a las proteínas que forman parte del complejo CD3, y en concreto de la subunidad ζ que es su sustrato ⁽²¹⁾. Otra tirosina-kinasa, la p59^{lyn}, está directamente asociada con el ReT. A su vez estas tirosina-kinasas se encuentran fosforiladas en varios de sus residuos y es precisamente la defosforilación en estos sitios la que inicia la activación de la p56^{lck}. CD45 media este proceso de defosforilación a través de la actividad tirosina-fosfatasa de su fragmento intracitoplásmico ⁽²¹⁾. CD45 se encuentra físicamente asociado al complejo CD3. De este modo la interacción del complejo ReT/CD3 con el Ag acerca las moléculas CD4 y CD8 a la proximidad con lo que la p56^{lck} es defosforilada por acción de la cola intracitoplásmica de CD45.

La fosforilación de los residuos de tirosina de la PLC desencadena luego otra serie de procesos bioquímicos en la activación celular T ⁽²²⁾. Esta PLC presente en la membrana celular hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-difosfato, uno de los fosfolípidos de la membrana, produciendo por una parte inositol trifosfato (IP₃) y por otra diacilglicerol (DAG). El IP₃ por su parte moviliza

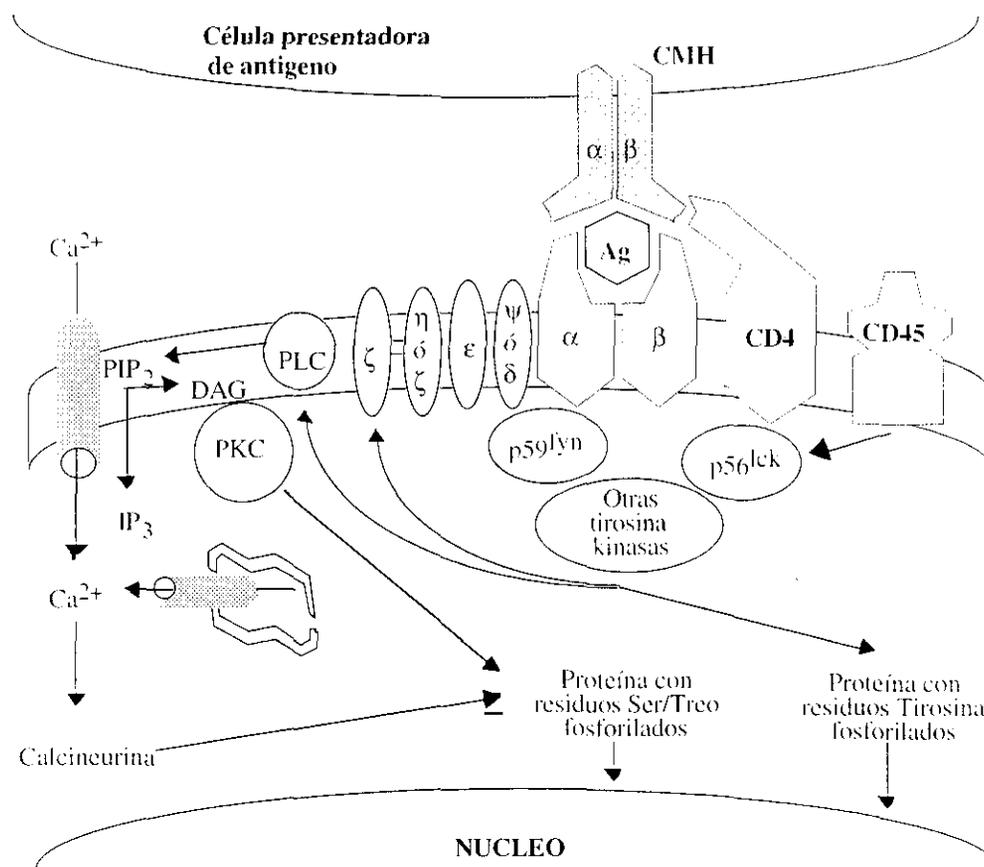


Figura IV.4. Mecanismos intracelulares de activación. En esta figura se muestran esquemáticamente la serie de eventos intracelulares que se desencadenan durante la activación del linfocito T a través del R α T/CD3. CMH = complejo mayor de histocompatibilidad; Ag = antígeno; PLC = fosfolipasa C; PIP₂ = fosfatidilinositol-4,5-difosfato; IP₃ = inositol trifosfato; DAG = diacilglicerol; PKC = proteína quinasa C.

los depósitos celulares de calcio ($[Ca^{2+}]$) contribuyendo al aumento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_{ic}$) característica después de la activación vía CD3. El aumento de la $[Ca^{2+}]_{ic}$ junto con la acción de la calmodulina induce la activación de otra proteína, la calcineurina, que tiene actividad serina-treonina quinasa. La ciclosporina A forma un complejo con la ciclofilina e inhibe la acción de la calcineurina en este paso. Por otro lado el DAG activa la proteína-quinasa C (PKC), otra serina-treonina quinasa que fosforila este tipo de residuos en otras proteínas (entre ellas la cadena γ del CD3, CD4, CD8 y CD18). Aunque en la célula T existen proteínas G asociadas a la membrana y ésta es una vía reconocida de mediación de señales transmembrana, no parece que sea una proteína G la responsable de acoplar la

activación del R ϵ T/CD3 con la de la PLC.

La importancia final de los mediadores IP₃ y DAG queda reflejada en el hecho de que *in vitro* es necesaria la acción de ambos para conseguir una activación completa en la célula T. La acción del IP₃ puede ser sustituida en el laboratorio por el efecto de ionóforos de calcio que aumenta la [Ca²⁺]_{ic}, mientras que la del DAG se puede sustituir por ésteres de forbol que activan directamente la PKC. Una combinación de ambas es necesaria para una adecuada activación, mientras que ninguna de ellas por separado es capaz de activar efectivamente a la célula ⁽¹¹⁾.

Muchas de las moléculas que participan en las interacciones entre células T y CPA transmiten igualmente señales transmembrana de activación y cooperan con las señales recibidas vía CD3 a que la activación sea completa y funcionalmente adecuada. La mayoría de ellas comparten parte de las vías de transmisión intracelulares con el complejo R ϵ T/CD3 (aumento de [Ca²⁺]_{ic}, cascada del fosfatidil inositol y actividad tirosina-kinasa), pero a diferencia de la vía del CD3 no activan, o lo hacen marginalmente, la PKC. Por este motivo la mayoría requieren coestímulos por esta vía para hacer proliferar a la célula. Entre estas moléculas se encuentra CD69 que será comentada en mayor detalle más adelante.

Una excepción importante es la transmisión de la señal vía CD28. A diferencia de muchas de las moléculas comentadas anteriormente, para la transmisión de la señal al interior de la célula a través de CD28 no es necesaria la coexpresión de CD3, y el aumento de IL-2 resultante es resistente en parte a la inhibición con ciclosporina A. Este último hecho, junto con la observación de que el estímulo a través de CD28 no aumenta de forma substancial la [Ca²⁺]_{ic} indican claramente que se trata de un mecanismo diferente al de CD3. Además, la activación vía CD28 sinergiza con estímulos mediados a través de activadores de la PKC y/o ionoforos de calcio. No se conocen en detalle los segundos mensajeros que forman parte de este

mecanismo pero la interacción de CD28 con su ligando natural induce la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas específicas de esta vía.

1.3 Activación genética y síntesis de DNA.

La consecuencia final de todos los procesos referidos más arriba es la activación ordenada y secuencial de una serie de genes en el núcleo de la célula T. La duración de toda esta serie de eventos es variable, pero aproximadamente pasan entre 7 y 10 días desde que una célula T recibe la primera señal hasta que completa su proceso de división. A lo largo de este tiempo se produce la activación y represión de numerosos genes que por su orden de aparición pueden ser calificados como inmediatos, precoces y tardíos. Los genes inmediatos no requieren síntesis de proteínas, mientras los precoces y tardíos sí. Los genes inmediatos y precoces se expresan antes de la división celular mientras los tardíos lo hacen sólo después de la mitosis. Hay que resaltar sin embargo que la activación de la célula T no es un fenómeno todo o nada, es decir, activación y expresión de marcadores en superficie no implica necesariamente que la célula T entre en ciclo celular y prolifere clonalmente. El resultado final (entrada en ciclo celular o no) dependerá del conjunto de señales recibidas por la célula T a través de sus múltiples moléculas en superficie. Cuando el conjunto de señales recibidas es apropiado se producirá la activación completa y la proliferación. Sin embargo es posible distinguir umbrales de activación en los que las células son capaces de expresar en superficie ciertas moléculas de activación pero no son capaces de adquirir el "compromiso" de entrar en ciclo y dividirse. En el linfocito T este punto de "compromiso" a entrar en ciclo celular viene determinado por la activación del gen de la IL-2⁽²³⁾. Esto equivale a decir que cuando la suma de señales recibidas a través de diversas moléculas es apropiada se produce la activación completa de los genes de IL-2 e IL-2R y la célula prolifera clonalmente. En el caso de señales subóptimas esto no ocurre pero sin embargo la célula puede expresar en su superficie los productos de genes más

precozes que el de la IL-2.

La "llave" por tanto de la proliferación celular en el linfocito T está en la activación y expresión del gen de la IL-2. La región "cebadora" de este gen se ha estudiado exhaustivamente y se ha observado que contiene al menos cuatro regiones críticas susceptibles de ser reguladas por la activación vía R ϵ T/CD3. A cada una de estas cuatro regiones (fragmentos de ADN) se unen proteínas activadas en el citoplasma como consecuencia de la acción de los segundos mensajeros. Estas proteínas que se ligan al ADN y son capaces de modificar su estado de activación se denominan factores de transcripción. La más proximal de estas regiones se denomina ARRE-1 (*Antigen Receptor Response Element*) y a ella se une el factor de transcripción NFIL-2A. Una segunda región de respuesta al R ϵ T es la ARRE-2 a la que se une la proteína NFAT-1 (*Nuclear Factor of Activated T Cells*).

La respuesta a los ésteres de forbol está conferida por la existencia de un sitio de unión a la proteína AP-1 en esta región "cebadora" del gen de la IL-2. Esta proteína está formada por la unión de los productos de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun*. Otra proteína que se une a este gen y es inducible mediante ésteres de forbol es NF- κ B. Por último, la activación de la célula T vía CD28 en presencia de ésteres de forbol resulta en la activación de una proteína llamada CD28RC (*CD28 Responsive Complex*) que se une a una región específica del ADN reconocida como CD28RE (*CD28 Responsive Element*), aumentando la actividad de la región cebadora y por tanto la tasa de transcripción del gen de la IL-2 (Figura IV.5).

Como ya ha sido mencionado anteriormente la producción de IL-2 constituye un paso crítico en la progresión de la célula T hasta la mitosis ⁽²⁴⁾. IL-2 se une a su receptor específico de alta afinidad IL-2R, pero esta molécula no se expresa en células T no activadas. El IL-2R se compone de tres cadenas polipeptídicas, una cadena de baja afinidad de 55 kD llamada α (también denominada Tac o CD25), una cadena de afinidad intermedia de 70 kD

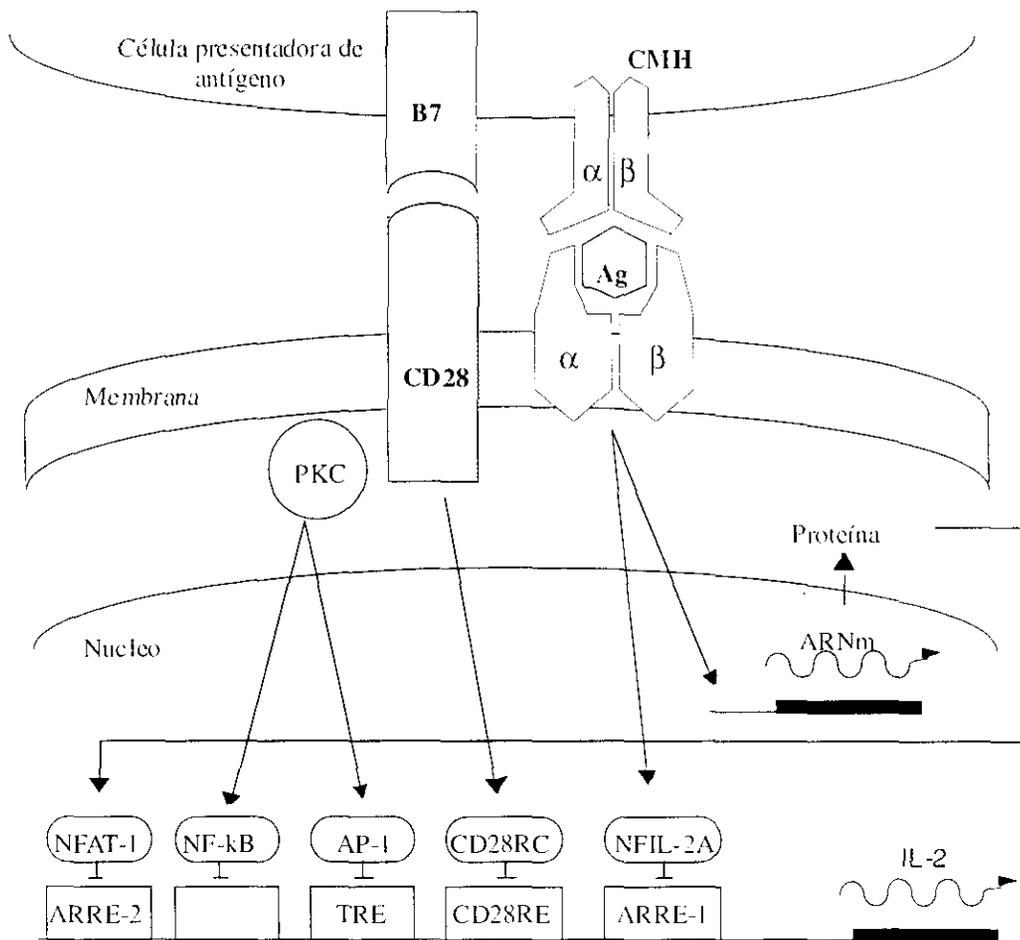


Figura IV.5. Activación del gen de la interleuquina 2. En esta figura se muestran esquemáticamente la serie de eventos intracelulares que se desencadenan durante la activación del linfocito T a través del ReT/CD3. CMH = complejo mayor de histocompatibilidad; Ag = antígeno; PKC = proteína quinasa C.

llamada β , y una cadena γ que por si sola es incapaz de ligar IL-2 pero que en unión a las otras dos cadenas aumenta mucho la afinidad por la molécula ⁽²⁵⁾. La unión de estas cadenas forma por tanto la estructura terciaria con una alta afinidad para la IL-2. La unión de IL-2 con IL-2R da lugar a la fosforilación de una serie de proteínas en sus residuos de tirosina ⁽²⁵⁾. La subunidad p70 (β) es suficiente para transmitir la señal y constituye por si misma un sustrato para la fosforilación de residuos de tirosina. Ninguna de las subunidades que componen IL-2R tienen una actividad tirosina-kinasa intrínseca, pero el complejo IL-2R se asocia con una actividad p56^{lck} similar a la que desarrolla

la asociada a CD4 y CD8.

IV. b. Patogenia de la artritis reumatoide.

Existe un amplio consenso en cuanto a que la AR es el resultado de la acción en concierto de varios factores hereditarios y no hereditarios (ambientales) que producen finalmente una profunda alteración en la regulación del sistema inmune. Existen muchas hipótesis sobre los factores ambientales y epidemiológicos que podrían jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad. Pero a pesar de ser hipótesis plausibles biológicamente, todas ellas sin excepción permanecen sin verificar. A continuación se revisan los factores genéticos y no genéticos implicados en la etiopatogenia de la AR, así como los aspectos más relevantes de la disregulación del sistema inmune y los mecanismos de producción de daño articular.

1. Susceptibilidad al desarrollo de la AR.

Gran parte de los trabajos publicados en los últimos quince años se han centrado en el estudio de las bases inmunogenéticas que confieren la susceptibilidad individual para la enfermedad; en especial, en relación con los locus HLA-D que controlan la expresión de algunos de los determinantes de clase II del CMH ⁽²⁶⁾. La mayoría de estos trabajos se basan en la hipótesis de que un determinado Ag (desconocido y probablemente no único) presentado a las células T en el contexto de estas moléculas clase II que conferirían cierta susceptibilidad a padecer la enfermedad, los activaría desencadenando todo el proceso ⁽²⁷⁾.

Las moléculas clase II son heterodímeros formados por dos cadenas llamadas α y β , que se expresan en la superficie de las CPA y que están codificadas por genes que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos. Dentro de estos genes, hay tres bien caracterizados (DR, DP y DQ)

para los que existen moléculas conocidas que se expresan en la superficie celular ⁽²⁸⁾.

Hace más de 10 años que se empezó a hablar de la asociación de estas moléculas con la AR, concretamente en un trabajo en el que se demostraba la alta frecuencia del tipo Dw4 definido mediante cultivo mixto de linfocitos (CML) en pacientes con AR ⁽²⁹⁾. En sucesivas publicaciones se asoció el riesgo relativo a padecer la enfermedad con los genes que codifican la especificidad serológica DR4. Numerosos estudios han apoyado esta asociación en sujetos de raza caucásiana (donde este alelo aparece aproximadamente en un 66% de pacientes con AR y un 26% de la población control) ⁽³⁰⁾, japoneses ⁽³¹⁾, y negros africanos ⁽³²⁾ entre otros, pero no se ha podido hacer lo mismo en otras poblaciones como judíos israelitas ⁽³³⁾, árabes ⁽³⁴⁾ o determinadas comunidades indias de los Estados Unidos ⁽³⁵⁾. En algunas de estas poblaciones en las que la AR no se asociaba a DR4 se ha encontrado una asociación alternativa con DR1 ⁽³³⁾, y en otros estudios se ha encontrado una menor prevalencia del serotipo DR2 en la enfermedad ⁽³⁶⁾ sugiriendo que se trataría un gen "protector".

Por tanto no existe un único gen que confiera el riesgo para padecer la AR, o por lo menos no lo existe entre las especificidades de HLA definidas serológicamente. Sin embargo es posible definir diversas subespecificidades dentro de ellas mediante CML. Dentro del DR4 estas subespecificidades se designan como Dw4, Dw10, Dw13, Dw14 y Dw15 ⁽³⁷⁾. De ellas solamente 2 (Dw4 y Dw14) muestran una asociación positiva con la AR en sujetos de raza caucásiana ⁽³⁸⁾, otra (Dw15) se asocia con AR en sujetos japoneses, mientras las otras dos muestran una asociación neutra o negativa con la enfermedad (Dw13 y Dw10 respectivamente). Curiosamente, Dw10 es la subespecificidad más frecuente de DR4 encontrada entre los judíos israelitas, en los que no se encontraba asociación entre AR y DR4.

En subsiguientes trabajos se han definido las bases moleculares para esta

asociación más claramente y se han agrupado bajo la hipótesis del "epítipo compartido" (39,40). Basándose en la secuenciación del ADN del gen que codifica las moléculas clase II ha sido posible obtener las diferentes secuencias de aminoácidos de las cadenas α y β de las distintas moléculas HLA. Según la hipótesis, diferencias estructurales definidas por la diferente disposición de los aminoácidos en la 3ª región hipervariable de la cadena β (locus HLA-DRB1) estarían influenciando la interacción entre la CPA, el Ag y el RcT. Los genes que codifican las moléculas DR y DQ se encuentran muy cerca por lo que habitualmente se transmiten en bloque, lo que se denomina un desequilibrio de unión. De esta forma la especificidad serológica DR4 (codificado por el locus DRB1) se acompaña habitualmente de DRw53 (codificado por DRB3) y DQw3 (codificado por DQB1 y DQA1). Sin embargo, todas las diferencias que existen entre los diferentes subtipos de DR4 pueden explicarse por la variabilidad del locus DRB1 y concretamente por la *variación de diferentes aminoácidos de la 3ª región hipervariable del primer dominio extracelular de la cadena β del heterodímero*. De acuerdo con los modelos tridimensionales de las moléculas clase I y II (41,42) se puede inferir que la 3ª región hipervariable del primer dominio extracelular es una zona de vital importancia para la interacción con el Ag y el RcT (43). Concretamente, la secuencia de la cadena DR β que está entre los aminoácidos 70 y 74 del extremo N-terminal de la molécula es la zona que está más expuesta para la interacción con el RcT (44). Las variaciones en esta zona parecen marcar las especificidades celulares entre los diferentes subtipos de DR4.

Un hecho notable es que una secuencia parecida a la de las subespecificidades de DR4 sería compartida por DR1, la otra especificidad serológica asociada con AR (45). En conjunto, un aminoácido glutamina en posición 70 y su asociación con arginina o lisina en posición 71 (todos ellos aminoácidos no polares) conferiría susceptibilidad para la enfermedad. Ello explicaría porque Dw4, Dw14, Dw15 y DR1 se asocian con la enfermedad y porque no lo hace Dw10, que presenta aminoácidos cargados negativamente en dichas posiciones. Los pacientes homocigotos para estos alelos asociados

es más probable que padezcan la enfermedad de forma más grave y más erosiva que los heterocigotos ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Otros trabajos que también apoyan esta hipótesis ⁽⁴⁹⁾, sugieren que la secuencia Q⁷⁰-K⁷¹-R⁷²-A⁷³-A⁷⁴ ó Q⁷⁰-R⁷¹-R⁷²-A⁷³-A⁷⁴ estarían fuertemente asociadas con la AR. Estos datos apuntan a que la susceptibilidad a padecer la enfermedad no estaría ligada estrictamente al haplotipo de HLA sino a la estructura conformacional del producto proteico del gen. Varios estudios han confirmado una correlación positiva entre enfermedad y la secuencia de aminoácidos asociada en griegos, chinos y negros sudafricanos ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. Sin embargo aproximadamente el 50% de los pacientes en estas series no mostraban ninguno de los alelos de HLA-DRB1 asociados a la enfermedad. La hipótesis del epítipo compartido falla también, o no es capaz de explicar completamente la asociación neutra con DR4 (Dw13) y los haplotipos DR3 de la enfermedad cuando ambos comparten una secuencia similar con Dw4 y Dw14.

Otros autores han propuesto que el residuo en posición 57 de DQB1 puede ser importante para conferir susceptibilidad a la enfermedad ⁽⁵³⁾. Los haplotipos de DQw que tuvieran en posición 57 un aminoácido polar se asociarían con la enfermedad según esta teoría, mientras que aquellos que tienen un aminoácido no polar (Ser, Val o Ala) tendrían una asociación negativa o neutra. Hay otros trabajos publicados que apoyan esta hipótesis: en uno de ellos ⁽⁵⁴⁾ se estudiaron las especificidades DQ en enfermos con AR y haplotipo serológico DR2. Aquellos que tenían un residuo polar en posición 57 se asociaban positivamente con la enfermedad, mientras que aquellos que no lo tenían no tenían asociación alguna. Es posible que en el caso de la AR la codificación de estos determinados aminoácidos en posición 57 del codon DQB1 sea sólo un marcador unido al verdadero responsable de la susceptibilidad. El papel específico de cada variante haplotípica puede ser diferente y más complejo que una simple asociación directa.

No existe relación entre AR y moléculas clase I pero sí se ha tratado de buscarla con moléculas clase III ^(55,56). Sanders y cols. no han encontrado diferencias significativas entre la frecuencia de genes de C4A y C4B entre

pacientes con AR y controles sanos, aunque sí había dentro de los haplotipos DR4. en el grupo de enfermos con AR. aumento del C4B2 y disminución del alelo nulo C4B*Q0⁽⁵⁷⁾. Dado que estos genes se encuentran en desequilibrio de unión con DR4 y HLA-B, es probable que también sean marcadores secundarios.

Más interés tiene el estudio de otros genes no HLA que también pueden estar asociados con un aumento de la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Las moléculas HLA presentan selectivamente fragmentos peptídicos y se empieza a conocer ahora cómo las CPA procesan y fragmentan proteínas complejas hasta degradarlas a estos pequeños fragmentos y cómo éstos se unen a las moléculas HLA⁽⁵⁸⁾. Sin embargo, cada vez hay más datos que apuntan a que existen otras formas de procesamiento de Ag. Las moléculas HLA clase II parecen asociarse y presentar preferentemente Ag proteicos exógenos, mientras las moléculas clase I pueden estar especializadas en unirse y presentar fragmentos peptídicos de proteínas endógenas. Los péptidos que se asocian finalmente con moléculas clase I tienen una localización característicamente citosólica. Las moléculas clase II son sintetizadas y unidas en el retículo endoplásmico rugoso y circulan a través del complejo de Golgi hasta las organelas unidas a la membrana. Al tiempo que realizan este camino van entrando en contacto con vesículas endocíticas que contienen péptidos derivados de Ag proteicos exógenos.

Los péptidos que se derivan de proteínas primariamente citosólicas (sintetizadas endógenamente) necesitan ser fragmentados y puestos en contacto con las moléculas HLA en la vía exocítica de transporte. Uno de los descubrimientos más recientes es que dentro de la región que codifica los genes de HLA clase II se encuentran los genes que están involucrados en el acoplamiento de las moléculas clase I. Dos de estos genes, llamados TAP (*Transporter in Antigen Processing*) 1 y 2, codifican las subunidades de una proteína heterodimérica que controla el transporte de péptidos desde el citosol al retículo endoplásmico. Es en este retículo donde los péptidos

inmunogénicos y las moléculas clase I se asocian.

El estudio del polimorfismo de los genes TAP en pacientes con AR ha dado algunos resultados. En concreto la frecuencia del alelo TAP2*0101-1693.A es significativamente mayor en pacientes con AR que en controles (59,60). Además, en uno de estos estudios, este alelo solo se encontró asociado a DR4 en pacientes con AR, lo que sugiere que el polimorfismo del gen TAP2 forme parte de un haplotipo extenso que es más frecuente en pacientes con AR. Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar si el polimorfismo en los genes TAP puede contribuir como un factor de riesgo genético en el desarrollo de AR.

2. Agentes exógenos y AR.

Desde hace mucho tiempo se ha ligado la AR con el virus de Epstein-Barr (EBV) con una base puramente epidemiológica. Se ha descrito la existencia de anticuerpos en suero de pacientes con AR que reaccionan contra extractos de células infectadas por EBV (61). El EBV tiene una glicoproteína en su superficie (gp 110) cuya secuencia Glu-Leu-Arg-Ala-Ala o Glu-Arg-Arg-Ala-Ala es similar a la del HLA Dw14 y DR1 (62) y ambas serían reconocidas por los mismos anticuerpos. Hay además otras razones para implicar a los EBV en la patogenia de la AR. Los EBV son activadores policlonales de las células B, y se ha descrito una mayor prevalencia de linfocitos B infectados por EBV en la sangre de pacientes con AR (63). Sin embargo, todas las tentativas de aislar productos del genoma de los EBV en tejido sinovial de pacientes con AR han resultado infructuosas (63) y desde luego, se desconoce qué papel concreto jugaría el EBV en la patogenia de la enfermedad. Otros virus propuestos como candidatos a iniciar o participar en el desarrollo de la AR son los parvovirus, lentivirus y virus de la rubeola entre otros (63).

Hay cuadros de inflamación poliarticular muy parecidos a la AR que

pueden ser inducidos en animales de experimentación mediante la inyección de productos bacterianos no viables como *mycobacterias* con adyuvante de Freund o peptidoglicano-polisacarido de la pared celular del estreptococo en medio salino. Pero lo que es más interesante, la enfermedad experimental puede transmitirse a otros animales mediante la inyección de las células T de las ratas enfermas a animales sanos ⁽⁶⁴⁾. Algunos de los clones generados mediante la inyección de los productos bacterianos reconocen tanto las *mycobacterias* como componentes articulares normales como, por ejemplo, el proteoglicano del cartílago articular ⁽⁶⁵⁾. Van Eden y cols. clonaron el epítipo reconocido por estas células T en el *Mycobacterium tuberculosis* y se comprobó que la administración de este Ag protegía del desarrollo de la enfermedad experimental a ratas sanas ⁽⁶⁶⁾. Se identificó también este Ag como parte de las proteínas de estrés ("*heat-shock*" proteins o HSPs) de 65 kD. Las HSPs son componentes celulares que pueden expresarse bien constitutivamente en las células o solamente en situaciones de estrés, y que muestran una alta homología a lo largo de toda la escala evolutiva ⁽⁶⁷⁾, tanto en seres eucariotes como procariotes. Koga y cols. han demostrado que clones de células T CD8⁺ desarrollados frente a la proteína de 65 kD del *Mycobacterium tuberculosis* pueden reconocer también HSPs expresadas por los macrófagos normales en condiciones de "estrés" en el contexto de moléculas clase I del CMH, tanto cuando éstos están infectados por el *Mycobacterium* como cuando no ⁽⁶⁸⁾. Según este trabajo, la expresión de HSPs por los macrófagos en condiciones normales no basta para estimular la activación T y B, que puede depender en último caso de la regulación al alza de esta expresión por péptidos bacterianos exógenos. Bajo condiciones de estrés la moléculas endógenas son procesadas y presentadas en el contexto de clase I con lo que servirían de diana para células T dirigidas contra epítipos compartidos de HSPs de 65 kD.

La HSP de 65 kD del *Mycobacterium tuberculosis* es un buen candidato a ser la proteína exógena ⁽⁶⁹⁾ pero no el único implicado en este tipo de autoinmunidad. La mayoría de los clones aislados de tejido y LS de AR que responden al *Mycobacterium tuberculosis* o la HSP de 65 kD no expresan el

heterodímero del RcT $\alpha\beta$ habitual en la mayoría de los linfocitos T, sino el otro dímero denominado $\gamma\delta$ ^(70,71). Las células de este subtipo carecen también de marcadores de superficie CD8 y CD4. Estos linfocitos son llamados gamma-delta o células doble negativas, y en condiciones normales se hallan en un bajo porcentaje tanto en SP como en LS. Sin embargo, en algunas enfermedades autoinmunes se encuentran en una proporción mayor, lo que les ha hecho centrar un buen número de investigaciones. Estas células T tienen una variabilidad mucho más limitada en sus cadenas $\gamma\delta$ que el RcT $\alpha\beta$. El proceso de reconocimiento del Ag al parecer no está tampoco mediado de la manera clásica por moléculas clase II ⁽⁷²⁾. La situación es curiosa, pues se conocen perfectamente la organización de los genes de linfocitos $\gamma\delta$ de SP pero se desconoce por completo su función. Sin embargo parece que esta célula con RcT $\gamma\delta$ reside entre las células epiteliales y podría jugar un importante papel como primera barrera inmunológica. En este lugar, la infección de las células epiteliales daría lugar a la expresión de un tipo nuevo de producto del gen CMH clase I que interaccionaría con el RcT $\gamma\delta$ y provocaría la activación de este subtipo de células y el desarrollo de sus funciones ⁽⁷³⁾.

Tsoufya y cols. han demostrado que los pacientes con AR tienen mayor número de anticuerpos frente a HSPs de 65 kD de *Mycobacterium tuberculosis* ⁽⁷⁴⁾ y Holoshitz y cols. han aislado clones de linfocitos T doble negativos del LS de enfermos con AR que son capaces de reconocer y responder a Ag de *Mycobacterias* sin restricción de CMH ⁽⁷⁵⁾. En otros casos, existe la evidencia de que determinantes antigénicos se unen al receptor $\gamma\delta$ de hibridomas humanos en asociación a CMH ⁽⁷⁶⁾. Algunas HSPs de las familias HSP-70 se codifican cerca de los locus de las moléculas clase III con lo que su expresión puede estar ligada a algunos de estos genes. Según esta hipótesis, la exposición de un determinado subtipo de células T que reconocerían un Ag tanto en células del huésped como en bacterias exógenas, motivaría su expansión y el inicio de la respuesta inmune aberrante en la AR ⁽⁷⁷⁾.

Dentro de las poblaciones con RcT $\alpha\beta$ presentes en SP, LS y membrana

sinovial (MS) de enfermos con AR también está aumentada la respuesta a Ag de Mycobacterias, y ésta no está restringida a pacientes con haplotipo DR4 (78). Ha habido varios trabajos en los que se ha observado una oligoclonalidad de las poblaciones de células T presentes en la MS de enfermos con AR (79,80), siendo posible en alguno de estos casos demostrar especificidad frente a algún Ag, como colágeno tipo II (81) o Mycobacterium tuberculosis (82). En la base de esta supuesta oligoclonalidad estaría la idea ya repetida de que un Ag podría desencadenar una respuesta específica y que el conocimiento de dicho Ag podría tener sus implicaciones terapéuticas de cara a frenar los clones de células T que se expandirían en su respuesta (83,84). Sin embargo otros trabajos no han podido demostrar esta oligoclonalidad y han encontrado poblaciones heterogéneas similares a las encontradas en SP (85,86). El tema de la clonalidad o heterogeneidad de las células T en la AR será comentado en mayor detalle más adelante.

3. Inmunoregulación en la AR.

La AR se caracteriza por una persistente actividad inmunológica dentro de la articulación. Como ha quedado dicho anteriormente se desconoce cuál es el estímulo etiológico que desencadena la enfermedad, pero parece claro que un flujo continuo de células inflamatorias hacia el microambiente sinovial y su actividad una vez allí, juegan un papel determinante en el mantenimiento de este estado de inflamación crónica. En la mayoría de modelos experimentales de AR se hipotetiza que las células T juegan un papel central en el desarrollo de la enfermedad. Según estas teorías, un hipotético agente externo artrotópico (virus, fragmentos de la pared bacteriana o un autoantígeno tal como colágeno tipo II, proteoglicanos o las propias moléculas clase II) serviría de estímulo para la activación de los linfocitos T. Estas células T activadas de una manera antígeno-específica iniciarían el proceso inflamatorio y expandiéndose dentro del microambiente sinovial reclutarían otras células inflamatorias (macrófagos, células B, fibroblastos, neutrófilos)

que contribuirían a mantener el proceso.

3.1 Papel de los linfocitos T en la AR.

De hecho, hay una larga serie de evidencias que sugieren que los linfocitos T juegan un papel fundamental en el desarrollo de la AR. En primer lugar, y dependiendo de la localización concreta de la célula como se verá más adelante, los linfocitos T de AR presentan signos claros de activación. De este modo, la densidad en superficie de las moléculas CD3 y CD4 está disminuida, y la expresión de CD69, HLA-DR, CD11a/CD18 (LFA1), CD9, CD49a/CD29 (VLA-1) y CD54 (ICAM-1) están aumentadas ⁽⁸⁷⁻⁹³⁾. En segundo lugar, la deplección o inhibición funcional de las células T mediante AcM anti CD4 o anti-CD5, drenaje del conducto torácico, irradiación linfoide total o linfaféresis periférica disminuye la inflamación sinovial ^(84,94). Tercero, la asociación a determinadas moléculas clase II sugiere que ciertos que los linfocitos T estarían restringidos en su respuesta a determinados Ag específicos por estas moléculas ⁽⁹⁵⁾. Finalmente, en pacientes con AR e infección por VIH, en los que las células CD4 están disminuidas en número o funcionalmente inactivas, existe una mejoría de la enfermedad ⁽⁹⁶⁾.

3.2 Análisis fenotípico de los linfocitos T en AR.

La membrana sinovial contiene un gran número de células mononucleares. Entre ellas predominan los linfocitos T, aunque también hay linfocitos B, células plasmáticas, células dendríticas y células de estirpe monocito-macrófago. Desde que se cuenta con AcM específicos para diferentes determinantes de la superficie celular ha sido posible caracterizar fenotípicamente estas células. Así, en la membrana sinovial existe una mayor proporción de células CD4⁺ sobre las CD8⁺ ⁽⁸⁷⁾, y estas células parecen estar activadas ya que expresan CD3 y CD4 con menor densidad (evaluada indirectamente mediante citometría de flujo por una menor intensidad de fluorescencia), y la expresión de CD69, HLA-DR, CD11a/CD18 (LFA1),

CD9, CD49a/CD29 (VLA-1) y CD54 (ICAM-1) esta aumentada (tabla IV.1) (87,92,93,97-103). Por otro lado se sabe que estas células expresan en menor cantidad L-selectina, que prácticamente todas ellas son células "memoria" ya que son CD29^{bright}, CD7^{dim}, CD45RO⁺ y CD45RA^{dim} (87,88,104) y son muy escasas las células "vírgenes" CD4⁺/CD45RA^{bright}. Se desconoce sin embargo si estas células se acumulan en la membrana sinovial como consecuencia de una mayor capacidad de migración de células T "memoria" activadas previamente o como resultado de la activación *in situ* de un subgrupo de células T "memoria" que habrían migrado preferencialmente.

Las células presentes en el LS de AR son también en su mayoría leucocitos (linfocitos y neutrófilos), acompañadas de monocitos, células dendríticas, células de la capa bordeante sinovial y, ocasionalmente, macrófagos. El análisis fenotípico de los linfocitos del LS de AR ha mostrado una población que tiene unas características muy similares a los linfocitos de membrana sinovial, con la importante excepción de una disminución del cociente CD4/CD8 respecto a SP y membrana de los mismos pacientes. De hecho, las células presentes en LS son células que han migrado desde la membrana y se acumulan en este compartimento desde donde volverían en algún momento a la SP a través de los linfáticos. La mayor diferencia por

Marcadores de diferenciación	Marcadores de activación	Moléculas de adhesión
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ CD45RB ^{dim} CD7 ^{dim} CD29 ^{bright}	CD69 ⁺ HLA-DR ⁺ VLA-1 ⁺ CD4 ^{dim} CD3 ^{dim}	LFA-1 ^{bright} CD44 ^{bright} LFA-3 ^{bright} ICAM-1 ⁺ VLA-4 ⁺ VLA-5 ⁺ α4/β7 ⁺ L-selectina

Tabla IV.1. Características fenotípicas de los linfocitos T de la membrana sinovial. Bright significa que el marcador de superficie correspondiente se expresa con alta intensidad de fluorescencia. Dim significa que el marcador de superficie correspondiente se expresa con baja intensidad de fluorescencia.

tanto entre las células de membrana y LS en AR es la mayor proporción de células CD8⁺ en este último compartimento. Es posible que la razón sea una mayor capacidad de movimiento en los linfocitos CD8⁺ por lo que su permanencia en la membrana sinovial sería menor, aunque también es posible que existan mecanismos específicos que retengan las células CD4⁺ en la membrana y los linfocitos CD8⁺ y los neutrófilos en el LS.

Con respecto a los linfocitos de SP, en varios trabajos se ha observado un aumento de células T que han sido activadas *in vivo* (HLA-DR⁺) en comparación con células T de donantes sanos (87,97,105,106). Sin embargo, no se ha demostrado en la mayoría de los estudios que exista una mayor expresión de otros antígenos de activación tanto precoces e intermedios (CD69, IL-2R α) como tardíos (VLA-1) en los linfocitos T de SP de pacientes con AR (87,102,107). En contrapartida, se ha descrito la existencia en SP de AR de una subpoblación de linfocitos CD4⁺/CD45RO⁻, es decir, con fenotipo de célula "virgen" que sí presentaban una expresión aumentada de IL-2R α (108). No obstante, parece que los linfocitos T de SP de AR, aunque no son completamente normales, tienden a mostrar menores signos de activación que los linfocitos de LS y membrana sinovial de los mismos pacientes.

3.3 Análisis funcional de los linfocitos T de AR.

A pesar de las evidencias a favor de un papel de los linfocitos T en el inicio y mantenimiento de la sinovitis crónica característica de la AR, otros autores han postulado que las células T sólo jugarían un papel marginal en todo ello (4). Esta hipótesis, en la que los macrófagos ocuparían el centro del escenario de la patogenia de la enfermedad, se basa en la paradoja de que, a pesar de que las células T son muy abundantes en LS y membrana sinovial y muestran claros signos de activación, las células T tienen un comportamiento funcional anormal.

En primer lugar es sorprendente que junto con los marcadores de

activación presentes en la superficie de las células T de membrana y LS de AR citados anteriormente no se encuentren dos de los más característicos como son los receptores para IL-2 (IL-2R α o CD25) y el receptor de transferrina (CD71) (87). Es más, la tasa de proliferación de los linfocitos T de LS o membrana sinovial es muy baja (109,110), como corresponde a una baja expresión de CD25 en superficie y a una escasa producción de ARNm de IL-2R α (el ARNm de IL-2R α es similar al que se encuentra en células T de SP en reposo (111)). Las figuras mitóticas son escasas en la MS y menos de un 1% de la síntesis total de ADN en tejido sinovial ocurre en las células linfoides (112,113). Además la mayoría de células T que entran en ciclo celular y están en fase S son células CD8⁺ y no CD4⁺ (114). Sin embargo, todas estas argumentaciones solamente conducen a concluir que los linfocitos T de LS y MS se encuentran en un estado de activación "raro", distinto del que se consigue al activar células T *in vitro* (115). Ello no quiere decir que no puedan cumplir determinadas funciones que pueden ser potencialmente relevantes en la patogenia de la enfermedad (87,107). De hecho para muchos autores, este estado de "postactivación" o activación "frustrada" podría indicar que estas células han sido activadas por vías alternativas independientes del RcT o que estuvieran detenidas por algún motivo en este estado en el curso de una activación vía RcT (102,116).

En segundo lugar ha llamado la atención la escasa detección de productos solubles derivados de las células T en la sinovial de AR. En ensayos llevados a cabo sobre células de LS y/o membrana sinovial no se detecta producción de IL-2, IL-3, IL-4, IFN- γ o TNF- β (111,117,118), todas ellas importantes linfoquinas producidas por las células T. Por el contrario, diferentes productos derivados de macrófagos, como son IL-1, TNF- α , IL-6, GM-CSF (factor estimulador de colonias granulocito-macrofágicas), M-CSF (factor estimulador de colonias macrofágicas), prostaglandinas o colagenasas, son muy abundantes tanto en LS como en la membrana (119). Todas ellas son también importantes citoquinas proinflamatorias y desempeñan un papel

importante en la patogenia de la AR.

También sería esperable que la población de linfocitos T de LS o membrana sinovial estuviera restringida clonalmente; es decir, en respuesta a un determinado Ag sólo los linfocitos con un RcT específico se expandirían clonalmente dentro de la articulación. Hasta ahora los estudios realizados utilizando sofisticadas técnicas de biología molecular han dado resultados muy dispares. Algunos trabajos han mostrado ciertas evidencias de clonalidad en el RcT, en concreto la presencia de RcT V β 14 en LS pero no en SP de pacientes con AR ⁽¹²⁰⁾ sugiriendo la participación de un superantígeno en esta restricción. Esta hipótesis ha sido ampliada en otro trabajo en el que preseleccionando células T IL-2R⁺ de tejido sinovial se encontró un predominio de células V β 3⁺, V β 14⁺ y V β 17⁺ ⁽¹²¹⁾. Todas estas cadenas β comparten además una misma secuencia de unión a superantígenos. Posteriormente también se ha demostrado que un superantígeno del *Mycoplasma arthritidis* activa preferentemente células T V β 17⁺ ⁽¹²²⁾. Frente a estos estudios existen otros muchos trabajos que no han podido demostrar ninguna oligoclonalidad ^(85,86,123-126). Ello no necesariamente implica que dicha oligoclonalidad no exista. Es posible que la aproximación no sea la más correcta para detectar oligoclonalidad. De hecho se podría pensar que el número de células antígeno-específicas, y por lo tanto oligoclonales, presentes en el LS o membrana este por debajo del umbral que estas técnicas pueden detectar (aproximadamente un 1%). La mayoría de los estudios están hechos con células obtenidas bien de LS o membrana de enfermos con AR de larga evolución, con lo que la población linfocitaria global obtenida puede estar distorsionada ⁽¹²⁷⁾ no siendo totalmente representativa de la que se obtendría en los primeros estadios de la enfermedad ⁽¹²⁵⁾. Por otro lado, y como se ha comentado anteriormente, sería posible que las células iniciadoras del proceso no fueran detectables utilizando "sondas" específicas para las cadenas α o β del RcT. Hay que recordar que tanto las HSPs como determinados Ag del *Mycobacterium tuberculosis* utilizan RcT $\gamma\delta$, con lo que escaparían de un análisis con esta metodología. Finalmente, la activación de los linfocitos T en presencia de determinados superantígenos podría ser diferente a la que se

produce en presencia de los Ag clásicos. En conclusión, la presencia o no de oligoclonalidad dentro de las células T de LS o MS de AR es un tema que está todavía por cerrar y por consiguiente es difícil extraer de ello conclusiones globales.

Un último argumento en contra de la célula T como eje vertebrador de la patogenia de la AR es que los tratamientos empleados que van directamente dirigidos contra la célula T, aunque producen una mejoría de los síntomas, no tienen una respuesta completa y además es limitada en el tiempo. Se postula que un método más racional de tratamiento iría encaminado a interrumpir el flujo de células mononucleares a la articulación y controlar la activación de fibroblastos y/o macrófagos. Sin embargo tales hipótesis están aún por desarrollar y no constituyen una contradicción por sí mismas a la teoría de las células T como centro del desarrollo de una respuesta inmune anormal que conlleva finalmente a la destrucción articular por mecanismos en los que otros muchos tipos de células pueden jugar un papel igualmente importante.

3.4 Mecanismos de migración linfocitaria en AR.

Las interacciones entre los linfocitos T y otras células han centrado durante muchos años la discusión de la patogenia de la AR. Sin embargo, no es menos importante el papel jugado por el endotelio vascular en la infiltración de la membrana sinovial por las células inflamatorias. De hecho, durante la inflamación crónica el endotelio vascular expresa receptores específicos que aumentan la capacidad de adhesión de las células mononucleares de SP ⁽¹²⁸⁾. Como consecuencia de un estímulo inflamatorio mantenido, el endotelio de las venas postcapilares del tejido sinovial cambia su morfología y se transforma en un tipo especial denominado "vénulas endoteliales altas" (HEV) ⁽¹²⁹⁾. Estos cambios son reversibles tras la administración de medicación remitiva, aún cuando el infiltrado linfocítico permanezca más o menos estable en la membrana sinovial ⁽¹³⁰⁾. Es posible que el tráfico de células se realice exclusivamente a través de estas zonas especializadas del endotelio, y el

mantenimiento de esta morfología especial depende de hecho del tráfico continuo de células y de la producción de citoquinas como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ (131).

Muchas de las moléculas que participan en los mecanismos de adhesión entre células T y otro tipo de células mononucleares son también responsables de la adhesión de estas células al endotelio vascular y de la migración a través del mismo. Estas moléculas se distribuyen en tres grandes familias de moléculas de adhesión, como son las superfamilias de las integrinas, inmunoglobulinas y selectinas (tabla IV.2).

Hay que resaltar también que es probable que muchas de estas interacciones celulares no sean exclusivamente fenómenos pasivos, sino que contribuyan a transmitir señales de activación a través de la membrana a ambas células. Por ejemplo, la interacción de LFA-1 y VLA-4 con sus correspondientes ligandos ICAM-1 y VCAM-1 o fibronectina respectivamente, contribuye a proporcionar señales coestimuladoras a las células (132,133). Los receptores de adhesión en las células endoteliales se regulan al alza como consecuencia de la acción de citoquinas proinflamatorias ($\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$) y endotoxina. A su vez, los ligandos específicos en las células mononucleares, que en su mayoría se expresan constitutivamente, sufren una regulación funcional mediada por los estímulos activadores. Tal es el caso de VLA-4, VLA-5, VLA-6, LFA-1 y Mac-1, pero no de CD2, selectina-L o CD44 (134,135).

El proceso de migración transendotelial puede dividirse en dos etapas. En un primer momento se producen una serie de interacciones no estables que contribuyen a enlentecer el flujo de células. Las moléculas responsables de las mismas parecen ser por un lado las selectinas-E y -P y su interacción con la selectina-L (136). En un segundo paso se producen interacciones más estables fundamentalmente entre diversas integrinas en las células mononucleares e ICAM-1 en las células endoteliales. Durante este proceso se regula a la baja la expresión de selectina-L y se regula al alza la expresión de Mac-1 y LFA-1.

Molécula	Sinónimos	Ligando	Distribución
Selectinas			
Selectina-E	ELAM-1	Sialil Lewis X, Selectina-L, CLA sialil Lewis A, LFA-1	CE
Selectina-L	LAM-1, MEL-14	PNAd, GlyCAM-1	Subgrupos de N, E, M, L
Selectina-P	GMP-140, PADGEM	Sialil Lewis X, Selectina-L, CD15	Plaquetas, CE
Integrinas			
α L β 2	LFA-1; CD11a/CD18	ICAM-1, -2 y -3	N, E, M, L
α M β 2	Mac-1; CD11b/CD18	ICAM-1, fibrinógeno, otros	N, E, M, NK
α X β 2	p150/95, CD11c/CD18	Fibrinógeno, otros	Subgrupos de N, E, M, L
α 4 β 1	VLA-4; CD49 α /CD29	VCAM-1, fibronectina	M, E, NK, L
α 4 β 7	LPAM-1	MA α CAM-1, VCAM-1, fibronectina	M, E, NK, L
Superfamilia de las inmunoglobulinas			
ICAM-1	CD54	α L β 2, α M β 2	CE, leucocitos, otros
ICAM-2	CD102	α L β 2	CE, leucocitos, otros
ICAM-3	CD50	α L β 2	Leucocitos, ¿CE?
LFA-3	CD58	CD2	CE, leucocitos
VCAM-1	CD106	α 4 β 1, (α 4 β 7)	CE, otras
MA α CAM-1	CD106	α 4 β 7	CE (mucosas)
PECAM-1	CD31	CD31, otras	CE, otras
Otras			
CD44		Hialuronato, otras	Leucocitos, CE, otras
VAP-1		¿?	CE

Tabla IV.2. Miembros de la familia de las selectinas, integrinas y superfamilia de las inmunoglobulinas de receptores de adhesión. ELAM-1: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1; CE: células endoteliales; LAM-1: Leukocyte adhesion molecule 1; PNAd: Peripheral lymph node adressin; N: Neutrófilos; E: Eosinófilos; M: Monocitos-macrófagos; L: Linfocitos; GMP-140: Granular membrane protein 140; LFA-1: Leukocyte function associated antigen 1; Mac-1: Macrophage antigen 1; ICAM: Intercellular adhesion molecule; MA α CAM-1: mucosal adressin cell adhesion molecule 1; PECAM: Platelet endothelial cell adhesion molecule; VAP-1: Vascular adhesion protein 1.

sufriendo estos últimos también una activación funcional. Otras muchas moléculas de adhesión podrían participar en este proceso, conformando un sistema redundante. Sin embargo, un número menor de moléculas participarían en el proceso de migración transendotelial y en la actualidad sólo la pareja LFA-1/CAM-1 y la molécula CD44 han sido implicados en ello (137,138).

Todo este proceso puede estar controlado a través de una serie de señales proporcionadas por mediadores solubles proinflamatorios producidos por las células endoteliales, linfocitos T y monocitos presentes en el tejido inflamatorio. Entre ellos destacan la IL-8, RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T Expressed, and Secreted*), MCP-1 (proteína quimiotáctica para monocitos) y MIP-1 α y -1 β (proteínas inflamatorias macrofágicas). Todas ellas son citoquinas de muy bajo peso molecular y tienen capacidad de quimiotaxis tanto para monocitos como para linfocitos (a excepción de MIP-1 que sólo tiene actividad frente a monocitos) (139). Todos los hallazgos sugieren que estas moléculas juegan un importante papel en la extravasación de células a los lugares de inflamación.

Las células endoteliales de AR hiperexpresan ICAM-1, VCAM-1, y selectinas-E y -P (140,141). Todos ellos pueden desempeñar importantes funciones en el proceso de adhesión y migración transendotelial, pero el hecho de que AcM anti-ICAM-1 sean capaces de abolir totalmente el proceso de migración transendotelial de los linfocitos *in vitro* (138) y que hayan demostrado también su utilidad para modificar la enfermedad *in vivo* (142), sugiere que ICAM-1 juega un papel fundamental. Una fracción de los linfocitos T de SP de pacientes con AR expresa LFA-1 ya activado funcionalmente (lo que no ocurre en SP de sujetos normales) y por lo tanto es competente para ligar ICAM-1 en el endotelio. Igualmente una fracción de células T de LS y MS de AR expresan la forma activada de VLA-4 que es capaz de ligar fibronectina *in vitro* (92). Todo ello implica que las células mononucleares de AR tiene una capacidad de adhesión aumentada que puede facilitar su migración al tejido sinovial. Si ello ocurre como consecuencia de

la recirculación de células que han sido previamente activadas en el tejido sinovial o por la activación de las mismas en sitios distantes de la membrana sinovial es algo que está por establecer.

De todo lo expuesto hasta aquí se deduce que el proceso de migración de células inflamatorias al tejido sinovial no es un fenómeno pasivo y que, por lo tanto, el hecho de que las células acumuladas en membrana y LS tengan un determinado fenotipo puede estar relacionado con su capacidad de migración específica. Es poco probable que las células que se acumulan en la sinovial sean células vírgenes CD45RA⁺ que luego diferencian *in situ* a células memoria CD45RA⁻/CD45RO⁺. Por el contrario las células CD4⁺/CD45RO⁺ tienen una mayor capacidad de adhesión al endotelio ⁽¹⁴³⁾ y de migración transendotelial ⁽¹⁴⁴⁾. Sin embargo no todas las células CD45RO⁺ que circulan en SP tienen la misma capacidad de migración. En particular, las que reúnen unas características fenotípicas de CD29^{bright}/selectina-L^{low}/CD7^{dim} son las que mayor capacidad migratoria exhiben ⁽¹⁴⁵⁾ y ello muestra una muy buena correlación con los hallazgos en membrana y LS de AR ⁽⁸⁷⁾. Una observación importante es que la activación del endotelio mediante citoquinas no influencia la cualidad de las células que migran a través de él, y sólo parece influenciar la cantidad de células que migran. Por otro lado, no existen diferencias entre las células con especial capacidad para migrar entre pacientes con AR o sujetos normales, con lo que la capacidad migratoria parece ser una cualidad intrínseca de un determinado tipo celular ⁽¹⁴⁴⁾.

En resumen, la actividad de todos estos receptores que median fenómenos de adhesión entre las células mononucleares y entre éstas y el endotelio vascular parecen tener un papel relevante en la patogenia de la AR. Ello no sólo ocurre a través de mecanismos más o menos inespecíficos de adhesión, si no que también pueden proveer señales coestimuladoras de activación. El interés de todos estos fenómenos no es meramente elucubratorio, sino que también podrían tener importantes implicaciones en el desarrollo de

nuevas terapias (146,147).

3.5 El papel de otras células en la AR.

Además del papel de los linfocitos T y los macrófagos en el desarrollo de la AR, otros tipos celulares pueden tener cierta relevancia en las alteraciones de la inmunoregulación que se produce en esta enfermedad. El desarrollo final de la lesión y la destrucción articular se comentará más adelante. Ahora vamos a centrarnos en el análisis de las alteraciones de los linfocitos B en la AR, y del papel que pudieran jugar las células dendríticas en el desarrollo de la enfermedad.

Los linfocitos B, funcionalmente anormales, parecen tener un cierto papel en la patogenia de la AR. De hecho células de estirpe B expresan antígenos de activación intermedios y tardíos y secretan espontáneamente factores reumatoides (FR) tanto en el infiltrado sinovial (148,149) como en SP (104,150,151). Junto a ello se ha descrito la hiperexpresión del antígeno de activación precoz CD23 (FcεR-II) en SP (152) y membrana sinovial (153), y también se encuentran mayores cantidades de CD23 soluble en SP (154) y LS (155) de pacientes con AR, sugiriendo que estas anormalidades funcionales se encuentran presentes ya desde las fases iniciales de la activación B. La razón de esta activación puede residir en que las células B en la AR parecen ser especialmente eficientes en sus respuestas a diferentes señales proporcionadas por las células T (156). El hallazgo de un aumento de la expresión de CD23 en SP y membrana, pero no en LS podría estar indicando que la AR es una enfermedad compartimentalizada, en la que los linfocitos B serían activados en respuesta a interacciones directas con las células T dentro de la sinovial pero recircularían a SP con mayor facilidad, teniendo una mayor importancia patogénica en el desarrollo de las manifestaciones extra-articulares de la enfermedad. De hecho la existencia de FR, que finalmente refleja una hiperactividad de las células B, se ha asociado a un peor pronóstico y a la existencia de manifestaciones tales como vasculitis. Mucho se ha trabajado

sobre el significado biológico del FR, pero con independencia del desarrollo de manifestaciones clínicas dependientes del depósito de inmunocomplejos, su papel en la patogenia de la AR parece ser limitado. Es posible que la existencia de un FR alto solamente esté indicando que las células B están siendo activadas policlonalmente en el curso de una disfunción de la inmunoregulación mucho más amplia.

Las células dendríticas (CD) son células con una forma estrellada característica, probablemente relacionadas con los macrófagos. Son incapaces de desarrollar ninguna función fagocítica, aunque pueden presentar Ag soluble a las células T, inducen proliferación en estas mismas células, generan células cooperadoras partiendo de poblaciones de linfocitos no primados y memoria, y por último conducen a las células B a diferenciar y producir anticuerpos ⁽¹⁵⁷⁾. Presentan un gran número de moléculas en su superficie lo que las hace ser las CPA más potentes conocidas ⁽¹⁵⁸⁾. De hecho, muchas de las moléculas que en otras CPA aparecen sólo tras su activación se expresan en las CD de forma constitutiva y con una gran densidad. Constituyen aproximadamente un 7-10% de las células presentes en LS de AR ⁽¹⁵⁹⁾, lo que supone una concentración 10-20 veces mayor de la que hay en SP. También existen CD en la membrana sinovial distribuidas tanto a lo largo de la capa *bordeante* como en zonas *perivasculares* donde se agrupan formando racimos con las células T ^(160,161). Algunos estudios han sugerido que el primer fenómeno que ocurre en el desarrollo de los infiltrados linfoplasmocitarios es la acumulación de una subpoblación de CD activadas seguido de un cambio morfológico en el endotelio vascular para adoptar la forma característica de "vénulas endoteliales altas" ⁽¹⁶²⁾. Las agrupaciones de CD con células T en SP incluyen tanto células CD4 como CD8. Estas agrupaciones celulares se forman de modo espontáneo en LS y difieren con los de SP en que se observa una mayor proporción de células CD8⁺ ⁽¹⁶³⁾. La potencia de las CD en el desarrollo de funciones de célula accesoria y su presencia en número aumentado (aunque no mayoritario) en el ambiente sinovial sugieren que

pueden tener un importante papel en el desarrollo de la AR.

3.6 Destrucción articular en la AR.

La principal característica tisular de la AR es la destrucción de la matriz extracelular, un proceso que depende en gran medida de la acción de una familia de enzimas proteolíticas que se conocen como metaloproteinasas. El sustrato sobre el que actúan estas enzimas difiere de una a otra. La colagenasa degrada colágeno tipo I, II, III, VII y X en su forma nativa de triple hélice; la gelatinasa por su parte degrada colágeno desnaturalizado. La estromelisinina tiene un ámbito de acción más amplio. Este sistema de enzimas degradadoras de la matriz extracelular está controlado *in vivo* por la acción de un sistema de inhibidores conocidos como "inhibidores tisulares de las metaloproteinasas" de los que al menos dos se encuentran caracterizados (TIMP-1 y TIMP-2).

En la membrana sinovial de AR existe una gran cantidad de estromelisinina, colagenasa y TIMP-1 ^(164,165). Utilizando técnicas de hibridación *in situ* se ha demostrado que la mayor fuente de todas estas enzimas se encuentra en la capa bordeante sinovial ⁽¹⁶⁶⁾. Se ha demostrado que existe una desproporción entre la presencia de estromelisinina y colagenasa por un lado y de TIMP-1 por otro en AR pero no en artrosis, donde todas estas enzimas también son detectables en la membrana. Diversas citoquinas juegan un importante papel en el control de la expresión de los genes de estas enzimas: por un lado IL-1 β y TNF- α aumentan la expresión de estromelisinina y colagenasa, teniendo poco o ningún efecto en la expresión de TIMP-1. Por el contrario, la IL-6 es un potente activador del TIMP-1 y no tiene efecto sobre las otras enzimas ⁽¹⁶⁷⁾. En cualquier caso, queda mucho por conocer sobre los mecanismos de regulación de la producción de metaloproteinasas y sus inhibidores, y en concreto sobre cuál o cuáles son los mecanismos que finalmente llevan a la disregulación de este sistema y a la destrucción tisular.

IV. c. La molécula CD69.

El análisis de la expresión, regulación y funcionalidad de la molécula CD69 en los linfocitos T de pacientes con AR constituye el centro de este trabajo. Ello justifica que dediquemos una atención especial a este antígeno de activación.

Como ha sido comentado anteriormente, el proceso de activación de los linfocitos T supone la transcripción secuencial y ordenada de un numeroso grupo de genes. De todos los antígenos de nueva síntesis que aparecen en la célula T durante su proceso de activación el de expresión más precoz es CD69, apareciendo aún antes que antígenos que eran considerados los más tempranos como IL-2R o 4F2. Esta molécula de activación fue descrita por cuatro grupos de trabajo distintos por lo que ha sido denominada EA1, MLR3, AIM, y Leu-23.

1. Descripción del CD69.

En 1986 Shu Man Fu y cols. describieron una molécula que aparecía en la superficie de un 6-7% de los linfocitos T de SP en reposo y que tras ser estimulados con PMA (Forbol Miristato Acetato, un éster de forbol) se expresaban en cerca del 90% de ellos en tan sólo 30 minutos por lo que fue denominado EA1 (*Early Activation Antigen 1*)⁽¹⁶⁸⁾. En 1987 Bargellessi y cols. investigaron la estructura y funcionalidad de un antígeno de activación, que era reconocido por un anticuerpo monoclonal de ratón que denominaron MLR3⁽¹⁶⁹⁾. Este antígeno, ausente en la superficie de los linfocitos T y timocitos en reposo, se expresaba en los primeros momentos tras la activación con fitohemaglutinina (PHA). En 1988 el grupo del Prof. Sánchez-Madrid, estudiando la posibilidad de que las células T pudieran recibir señales inductoras de proliferación mediante AcM dirigidos contra distintas moléculas de superficie, aislaron cinco AcM dirigidos contra una misma molécula que aparecía a las 3 horas del estímulo activador y que denominaron "molécula

inductora de activación" (AIM) ⁽¹⁷⁰⁾. En ese mismo año el grupo de Phillips describió un Ag. Leu-23, que aparecía a las 6 horas de estimular algunos linfocitos T y células NK con IL-2 ⁽¹⁷¹⁾.

Desde el año 1989 estas cuatro moléculas se agrupan bajo la denominación de "antígeno CD69" ⁽¹⁷²⁾ por poseer una distribución celular y unas características funcionales similares.

2. Estructura molecular del CD69.

El CD69 es una glicoproteína homodimérica de membrana, formada por dos polipéptidos de 32 y 28 kD unidos por puentes disulfuro, en la que se han identificado cuatro epítomos distintos. Tres de ellos están situados por fuera de la membrana plasmática (sitios E1-E3), y uno es intracelular (sitio I) estando probablemente implicado en la transmisión de las señales de activación ⁽¹⁷³⁾.

Esta proteína ha sido recientemente clonada ⁽¹⁷⁴⁻¹⁷⁶⁾. La secuencia del ADNc obtenida en estos estudios predice una proteína de 199 aminoácidos con una topología transmembrana de tipo II con dominios extracelular (C-terminal), transmembrana e intracelular (figura IV.6). Los dos homodímeros son el resultado de una diferente glicosilación de esta proteína de 199 aminoácidos que está codificada por un único gen. Estos productos pueden

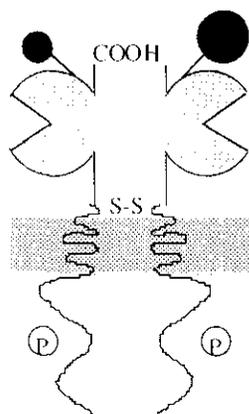


Figura IV.6. Estructura del CD69 humano. Las áreas grises corresponden a los dominios de unión a carbohidratos: los círculos negros representan azúcares ligados. S-S indica los puentes disulfuro entre ambas cadenas y P representa los sitios de fosforilación constitutiva. La diferencia de tamaño de los círculos negros indica la glicosilación diferencial de la molécula de CD69 humana

unirse formando dímeros de 28-28, 28-32 y 32-32 kD. El significado funcional y estructural de esta heterogeneidad es desconocido. Ambas cadenas se encuentran fosforiladas constitutivamente en sus residuos de serina. En los 40 aminoácidos de su porción intracelular, existen ocho residuos de serina, de los cuales los residuos Ser¹⁸ y Ser³⁰ representan lugares de fosforilación bajo la acción de las enzimas casein kinasa II (CKII) y proteína-kinasa C (PKC). Este patrón de fosforilación tiene importantes implicaciones en la transmisión de señales a través de la membrana.

El ARNm codificado por el ADNc de CD69 es rápidamente inducido y degradado después de la estimulación linfocítica. Este patrón de expresión genética es muy parecido al de los proto-oncogenes y la mayoría de las citoquinas derivadas de linfocitos, siendo claramente distinto al de otros antígenos de activación linfocitaria tales como IL-2R y CD71 que muestran unas cinéticas de activación y degradación más lentas. La expresión en superficie de la proteína CD69 persiste durante más tiempo sin embargo, lo que se debe a su alta estabilidad y resistencia a los mecanismos de degradación proteolítica. CD69 tiene una alta homología con otras moléculas de la superfamilia de las lectinas animales tipo-C (Ca²⁺ dependiente) de receptores transmembrana tipo II, entre ellas CD23 (un Ag de activación de células B) y NKG2 (un Ag de activación específico de células NK). Se ha demostrado que los oligómeros tipo II que expresan dominios de unión a lectinas tipo-C están involucrados en la endocitosis y degradación de glicoproteínas así como en la defensa inmunológica innata mediando la unión de residuos de azúcar de la superficie celular de bacterias, parásitos y hongos. Sin embargo, el reconocimiento de carbohidratos en la superficie de otras células no es necesariamente la única característica de esta familia de receptores, ya que CD23 y CD72 también se unen a estructuras proteicas definidas como CD21 y CD5 respectivamente.

La homología de CD69 es más marcada con unos miembros de la familia de receptores que con otros. Concretamente con los antígenos Ly-49, NKR-P1 y NKG2 no sólo comparte una alta homología de secuencia y la

misma localización cromosómica, sino que todas ellas son homodímeros formados por glicoproteínas transmembrana únicas tipo II y son capaces de generar señales intracelulares. Sin embargo, CD69 parece representar una molécula funcionalmente distinta por su distribución celular (más amplia que sus homólogos) y los requerimientos para su expresión.

3. Células que expresan CD69.

CD69 se detecta en un pequeño porcentaje (menor del 7%) de linfocitos T, B y células NK de SP de sujetos normales. Tras estímulo con PMA se expresa en prácticamente el 100% de los linfocitos de SP, correspondiendo el mayor porcentaje y la mayor intensidad de expresión a las células T. La ausencia de CD69 de los linfocitos de SP (LSP) contrasta con su expresión de forma constitutiva en diferentes órganos linfoides. Aproximadamente un 15% de los timocitos totales expresa CD69. Utilizando técnicas de doble marcaje se detecta expresión de CD69 en el 50% de los timocitos CD3⁺/CD1⁻ (medulares) en reposo, mientras que no se detecta en los timocitos CD3⁻/CD1⁻ (corticales). Es interesante resaltar por tanto que CD69 se expresa en un subgrupo de timocitos maduros. Tras la activación con PMA se expresa en un 80% de los timocitos totales y en más de un 60% de ambos subgrupos. Se desconoce si los timocitos CD69⁺/CD3⁺ se comportan funcionalmente de una forma distinta a los timocitos CD69⁻/CD3⁺ o a los linfocitos de SP CD69⁻/CD3⁺. En amígdala un 22% de los linfocitos totales expresan constitutivamente CD69. Entre ellos, los que lo expresan en un mayor porcentaje y con mayor intensidad son los de los centros germinales (células CD3⁺), luego los de la zona paracortical y por último las células del manto (células B). Después de ser activadas con PMA tanto las células T como las B adquieren CD69. Parece probable que la expresión de CD69 en un subgrupo de los linfocitos de los órganos linfoides indique que estas células están sometidas a un proceso de activación. Alternativamente, se podría especular con que CD69 es adquirida por los linfocitos para interactuar con otras

células durante sus procesos de migración y alocaación tisular ⁽¹⁷⁷⁾.

CD69 también se expresa en precursores mieloides de la medula ósea, neutrófilos y eosinófilos activados, monocitos circulantes, células de Langerhans y plaquetas ^(178,179) pero no en eritrocitos ni en órganos no linfoides como piel, hígado, bazo, riñón, pulmón o cerebro ⁽¹⁷⁷⁾.

4. Regulación de la expresión de CD69.

La expresión de CD69 se induce rápidamente tras la estimulación del complejo RcT/CD3 en las células T, el entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie (IgS) en células B y por IL-2, IFN- α y AcM anti-CD16 en células NK. En las células T, los transcritos de CD69 son detectables entre 30 y 60 minutos después de la activación del RcT/CD3 y disminuyen rápidamente después de 4-6 horas. Se detecta su expresión en superficie a las 2-3 horas, alcanza niveles máximos a las 18-24 horas y disminuye progresivamente hasta desaparecer a las 72 horas si se retira el estímulo activador. Los ésteres del forbol son también unos buenos inductores de la expresión de la molécula CD69. En los linfocitos de SP estimulados con PMA se detecta CD69 a los 30 minutos de estímulo. Después de una hora de activación entre 85-90% de las células T son CD69⁺. Otros estímulos como fitohemaglutinina (PHA) y AcM anti-CD3, anti-CD2 o anti-CD28 son capaces, aunque en menor intensidad, de desencadenar expresión del CD69 ⁽¹⁸⁰⁻¹⁸²⁾. Por el contrario los ionóforos del calcio por sí solos no inducen en absoluto su expresión. En todos los casos, la cinética de activación es muy parecida, y CD69 desaparece de la superficie celular en aproximadamente 72 horas si se retira el estímulo. Esta cinética de expresión es una de las características por las que su estudio tiene un especial interés, ya que, a diferencia de otras moléculas de activación, CD69 nos habla de procesos que están ocurriendo en un corto espacio de tiempo.

La expresión de esta molécula a través de RcT/CD3 depende de una

elevación mantenida en la $[Ca^{2+}]_i$ y de la activación de la PKC como lo demuestra el hecho de que al inhibir esta enzima se bloquea la expresión del CD69 y por el contrario se puede inducir con análogos del DAG^(181,183). En células NK, a diferencia de lo que ocurre en células T, CD69 puede ser inducido mediante AcM anti-CD16, IL-2 e IFN- γ aún en presencia de inhibidores de la PKC⁽¹⁸⁴⁾.

Para que el CD69 se exprese en la membrana se necesita de la síntesis de ARN y proteínas como se ha demostrado bloqueando su expresión a distintos niveles con cicloheximida (que inhibe la síntesis de proteínas) o actinomicina-D (que inhibe la síntesis de ARN). Sin embargo, el elemento clave final para que se exprese CD69 en superficie parece ser la activación de la proteína *Ras*. De hecho, la expresión de un gen de *v-Ha-ras* en células Jurkat que codifica una proteína *Ras* activa que liga GTP es suficiente para una inducción óptima de CD69. Por el contrario, la introducción de un gen de *Ras* mutante, *c-HA-ras-N17*, previene la inducción de CD69 tras la activación celular a través del R α T/CD3.

Aunque se conoce poco de la regulación de la expresión de CD69 a nivel del gen, se ha identificado una región con actividad promotora inducible por PMA a 700 pb del lugar 5' de inicio de la transcripción del gen. Esta región contiene sitios de unión para varios factores de transcripción como NF- κ B, Oct-1/Oct-2, PU.1 y varios miembros de la familia GATA que pueden tener un papel en la inducción y especificidad de tejido en la expresión del gen de CD69

5. Acciones biológicas del CD69.

Se desconoce cuál es el ligando natural de CD69, pero AcM dirigidos contra la molécula son capaces de generar señales transmitidas al interior de la célula y de sinergizar con otras señales colaborando en el desarrollo de diversas funciones. La primera acción descrita de CD69 fue su capacidad de

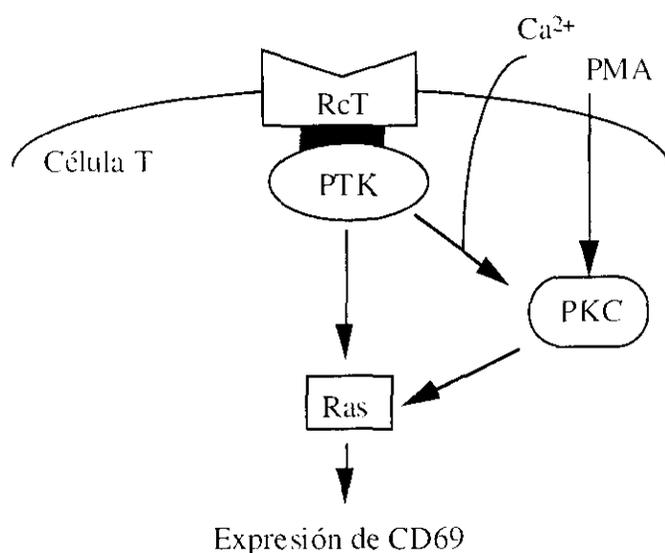


Figura IV.7. Modelo de transmisión de señal que induce la expresión de CD69 en los linfocitos T. El estímulo en el receptor de la célula T y la activación con PMA inducen la activación de la proteína Ras. Esta vía supone también la activación de proteín-tirosín kinasas (PTK) y la proteín-kinasa C (PKC).

inducir una respuesta proliferativa en LSP ^(168.170), por lo que se considera una vía accesoria de activación celular. Para ello necesita de un coestímulo de la PKC como demuestra el hecho de que la unión de los AcM anti-CD69 a la molécula no es suficiente para inducir proliferación a menos que simultáneamente se estimule la PKC mediante un activador del tipo de los ésteres del *forbol*. Las señales desencadenadas por el estímulo a través de esta vía implican un aumento prolongado del $[Ca^{2+}]_{ic}$ y a su vez una modesta activación de la PKC. Para que la señal sea efectiva los AcM anti-CD69 necesitan estar entrecruzados, y no existen diferencias en cuanto a transmisión de la señal y proliferación entre los subtipos de células T CD4 ó CD8.

El estímulo a través de CD69 induce la expresión de CD25 y la producción de IL-2 e IFN- γ en presencia de PMA, y todo ello es inhibible con ciclosporina A, lo que de nuevo indica la dependencia del aumento de la $[Ca^{2+}]_{ic}$ ⁽¹⁸⁵⁾. La generación de una señal activadora a través de CD69 en linfocitos maduros requiere de la coexpresión de CD3 ⁽¹⁸⁶⁾, lo que sugiere que ambos actúan en concierto para la producción de dicha señal. CD69 media un aumento del $[Ca^{2+}]_{ic}$ y activa selectivamente la fosfolipasa A_2 citosólica (PLA₂). También se ha demostrado el papel del CD69 como vía de inducción de TNF- α en los linfocitos T ⁽¹⁸⁷⁾. Por otro lado, la adquisición de CD69 por las células NK corre en paralelo con la adquisición de la actividad lítica, lo

que sugiere la participación de esta molécula en estos fenómenos ⁽¹⁷¹⁾.

Es interesante señalar que la activación de los linfocitos T de SP a través de CD69 produce un aumento transitorio de la expresión del gen de *c-fos*, que a su vez regula la actividad del factor de transcripción AP-1, por lo que parece que esta vía es crucial en la iniciación de la activación T ⁽¹⁸⁸⁾. Además de la inducción de AP-1, la inducción de complejos NF-AT tras la activación a través de CD69 en presencia de PMA, participan en la regulación del gen de la IL-2 a nivel transcripcional en los linfocitos T ⁽¹⁸⁹⁾.

Las características de inducción, expresión, regulación y función de la molécula CD69 en comparación con las de otros Ag de activación, la hacen especialmente útil para el estudio de los eventos más precoces de la activación celular, y en particular el estado de activación celular de los linfocitos del líquido sinovial de pacientes con AR.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes.

Se seleccionaron para este estudio pacientes con AR y enfermedad activa. El diagnóstico de AR fue establecido de acuerdo con los criterios revisados en 1987 del American College of Rheumatism (antes American Rheumatism Association) (tabla 1) ⁽¹⁹⁰⁾. Se definió que la enfermedad estaba en actividad cuando se reunieron al menos tres de los siguientes cuatro criterios: (a) rigidez matutina \geq 45 minutos, (b) velocidad de sedimentación globular \geq 28 mm/hora, (c) presencia de tres o más articulaciones hinchadas y/o (d) presencia de más de seis articulaciones dolorosas a la movilización. La mayoría de los pacientes se encontraban en tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad y ninguno de ellos tomaba más de 10 mg/día de prednisona. La edad media de los pacientes era de 54 años, la duración media de la enfermedad era de 3 años y todos los pacientes excepto cuatro tenían FR positivo.

CRITERIOS PROPUESTOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LA ARTRITIS REUMATOIDE
1. Rigidez matutina superior a una hora, presente durante al menos 6 semanas.
2. Inflamación de 3 o más articulaciones con una duración superior a seis semanas.
3. Inflamación de la muñeca, articulaciones metacarpofalángicas o interfalángicas proximales, durante 6 o más semanas.
4. Inflamación articular con carácter simétrico.
5. Cambios radiológicos típicos de artritis reumatoide en las manos: erosiones u osteoporosis yuxta-articular indudable.
6. Nódulos reumatoides.
7. Factor reumatoide, detectado por un método que resulte positivo en menos de un 5% de la población normal.

Tabla V.1. Criterios de clasificación de artritis reumatoide. Según estos criterios revisados de la American Rheumatism Association (1987), se puede clasificar a un paciente como artritis reumatoide cuando reúne 4 criterios o más.

Como grupo control se utilizó la sangre de voluntarios sanos, la mayoría de ellos trabajadores del hospital, o pacientes sometidos a cirugía menor sin enfermedades crónicas o sistémicas. Todos los pacientes y controles eran de raza caucasiana. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas por venopunción en la cara anterior del antebrazo. Las muestras de LS se obtuvieron mediante artrocentesis de la rodilla en condiciones de asepsia. Todas las muestras fueron recogidas en jeringas previamente heparinizadas tras obtener el consentimiento de los pacientes.

2. Preparación de las células.

Las muestras de sangre y LS fueron diluidas en solución de Hanks (Grand Island Biological Co [GIBCO] BRL, Paisley, Escocia) en una proporción de 1/2. Los linfocitos de sangre periférica (LSP) y del líquido sinovial (LLS) fueron aislados por gradientes de densidad mediante centrifugación sobre Ficoll-Hypaque durante 25 minutos a 1800 r.p.m. a temperatura ambiente. Las células obtenidas de la interfase fueron lavadas a 1500 r.p.m. durante 15 minutos y posteriormente dos veces más a 1200 r.p.m. durante 10 minutos, siempre diluidas en solución de Hanks. Tras ello, se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Flow Laboratories, Irvine, Escocia) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal ([STF], GIBCO BRL, Paisley, Escocia), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL), y glutamina (2 mM). Este medio de cultivo será referido como medio final de cultivo (MFC).

Para obtener una mayor purificación en células T, los LSP y los LLS fueron roseteados con hematíes de carnero tratados previamente con neuraminidasa (N-HC) durante 1 hora a 4 °C, como se ha descrito previamente ⁽¹⁹¹⁾. En resumen, los hematíes de carnero (Bio-merieux SA, Marcy-L'Etoile, Francia) fueron lavados 3 veces en suero salino fisiológico y posteriormente incubados en baño a 37°C con neuraminidasa (Sigma), a una proporción de 0.3 U para 10 mL de hematíes de carnero al 2% en suero salino.

durante 20 minutos. Para la separación celular los LSP fueron incubados en MFC, STF y N-HC durante 1 h a 4° C. Tras la incubación se resuspendieron cuidadosamente y se procedió de nuevo a la separación mediante gradientes de densidad por centrifugación en Ficoll-Hypaque de manera similar a la descrita más arriba. Se obtuvieron así dos poblaciones, una adherida a los N-HC (población E⁺) compuesta principalmente por linfocitos T y otra no adherida (población E⁻) compuesta principalmente por linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. Los N-HC fueron lisados con agua destilada y las poblaciones E⁺ y E⁻ fueron repetidamente lavadas a 1000 r.p.m. durante 10 minutos en solución de Hanks.

Para algunos experimentos, las células E⁺ fueron aún más depleccionadas de células E⁻ mediante selección negativa utilizando bolas magnéticas con anti-IgG de ratón (Immunotech, Marseille Cedex, Francia) conjugadas con cantidades saturantes de AcM anti-CD14 (Immunotech), anti-OKM1 (Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ, USA) y anti-HLA-DR (Q2.70, donado por el Dr. F. Díaz-Espada, Clínica Puerta de Hierro, Madrid) en SP y anti-CD14 y anti-OKM1 en LS. La población de linfocitos T obtenida de este modo fue siempre >90% de células CD3⁺, <6% monocitos y <1% células B tal y como se comprobó por citometría de flujo utilizando los AcM anti-CD3, anti-CD14 y anti-IgS. Las células E⁻ fueron depleccionadas de células E⁺ mediante selección negativa utilizando bolas magnéticas con anti-IgG de ratón conjugadas con cantidades saturantes de AcM anti-CD3. La población de células no T así obtenida fue siempre <5% CD3⁺ tal y como se comprobó por citometría de flujo.

3. Análisis del fenotipo.

Los siguientes AcM que reconocen distintos determinantes en la superficie celular fueron utilizados a concentraciones saturantes para el análisis del fenotipo celular: anti-CD3 (OKT3, Ortho Diagnostic Systems Inc.), anti-CD4 (Coulter Immunology, Hialeah, FL, USA), anti-CD8 (Coulter

Immunology), anti-CD25 (Coulter Immunology), anti-HLA-DR (Q2.70) y anti-CD69 (TP 1/55, anticuerpo IgG2b de ratón anti-CD69 humano, donado por el Prof. F. Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid).

Para estos experimentos todo el procedimiento se llevo a cabo a 4 °C a menos que se indique lo contrario. En los experimentos de marcaje simple, las células fueron repetidamente lavadas en suero salino tamponado con fosfato (PBS) conteniendo un 1% de albúmina bovina sérica (BSA). Tras ello, se incubaron durante una hora con los AcM anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-HLA-DR y anti-CD69. Después de lavar de nuevo en PBS-BSA, las células fueron incubadas durante otra hora con fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fluoresceína (Kallestad, Austin, TX, USA). Los resultados de estos experimentos se expresan como el porcentaje de células positivas para cada AcM [\pm desviación estándar (DE)] tras restar la fluorescencia de fondo obtenida tras incubar las células con un AcM de ratón del mismo isotipo irrelevante como primer anticuerpo.

En los experimentos de doble marcaje las células fueron incubadas durante una hora con los AcM anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-HLA-DR y anti-CD25 como primeros anticuerpos, seguido tres lavados de 5 minutos con PBS y de incubación durante otra hora con fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fluoresceína. Tras esto, las células se lavaron tres veces durante 5 minutos en PBS y se incubaron durante una hora con suero normal de ratón. Después de lavar de nuevo se incubaron con un AcM anti-CD69 biotinado (TP 1/55) durante una hora y, tras tres nuevos lavados en PBS, con ficoeritroína al 10%. Como controles se utilizaron AcM irrelevantes de ratón del mismo isotipo. Se analizaron entonces los porcentajes relativos de CD3, CD4, CD8, CD25 y HLA-DR dentro de las poblaciones CD69⁺ y CD69⁻ de los linfocitos T del LS. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas (\pm DE) para cada AcM tras restar la fluorescencia de fondo obtenida con el Ac control.

La fluorescencia celular fue analizada utilizando un citómetro de flujo EPICS Profile II (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA), seleccionando la población de linfocitos (que excluye los monocitos) y contando 5×10^3 células por muestra. La densidad de cada determinante fue analizada indirectamente calculando la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células analizadas. Los valores de la IFM para cada AcM se obtuvieron en una escala logarítmica y los datos se convirtieron a unidades lineales arbitrarias utilizando la fórmula 10^x , donde x = canal de fluorescencia media en escala logarítmica/número de canales por década (número de canales/número de décadas) ⁽¹⁹²⁾.

4. Ensayo de mantenimiento del CD69.

Las células T purificadas de LS fueron cultivadas durante 120 horas en tubos de plástico de fondo redondo de 3 mL (Soria Greiner, Madrid) en solitario o mezcladas en una proporción 1/1 con células no T de LS autólogas en 1 mL de MFC a una concentración de 1×10^6 células/mL. Se utilizaron LSP de pacientes con AR previamente estimulados durante 17 horas con AcM anti-CD3 cultivados en paralelo como control. En algunos experimentos tanto las células T como las no T de LS fueron preincubadas por separado durante 60 minutos a 4 °C con concentraciones saturantes de un AcM anti-CD18 (TS1/18, donado por el Prof. F. Sánchez-Madrid) antes de ser mezcladas y cultivadas como se ha indicado anteriormente. En otros experimentos las células no T de LS fueron tratadas antes de cultivar con las células T con una solución al 0.05% de paraformaldehído (PF) como se ha descrito previamente ⁽¹⁹³⁾. En resumen, las células no T fueron incubadas con 1 mL de paraformaldehído al 0.05% en PBS a temperatura ambiente durante 1 minuto. La reacción fue detenida mediante la adición de medio RPMI 1640 conteniendo un 10% de STF. Las células fueron entonces repetidamente lavadas en solución de Hanks antes de mezclarlas con las células T de LS. La expresión en superficie de CD69 fue valorada mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente en diferentes momentos del cultivo.

5. Ensayos de proliferación.

Los LSP de pacientes con AR o controles y los LLS de pacientes con AR fueron cultivados a una concentración de 2×10^5 células/200 μ l en MFC y activados en cultivos por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar, High Wycombe, Inglaterra), manteniéndolas a 37 °C en una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂ durante 72 horas. Para activar las células se utilizaron AcM anti-CD3 (OKT3, IgG2a de ratón anti-CD3 humano obtenido de la ATCC, a una dilución final de 1:50 [194]), PMA (2 ng/mL, Sigma Chemical Co.), IL-2 recombinante humana ([rIL-2] 10 UI/mL, Sigma Chemical Co.), AcM anti-CD28 (clon L293, AcM de ratón anti-CD28 humano a una concentración de 400 ng/mL, Becton Dickinson European HQ, Erembodegen-Aalst, Bélgica) y el AcM anti-CD69 TP 1/8X (IgG2b de ratón anti-CD69 humano, 250 μ l/mL del sobrenadante, donado por el Prof. F. Sánchez-Madrid). Todos los sobrenadantes de hibridomas fueron utilizados en una cantidad en la que inducían una proliferación óptima según los experimentos de dosis respuesta realizados previamente. La proliferación celular fue estimada mediante la incorporación de timidina tritiada ([³H]TdR, 1 μ Ci=37KBq, Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) durante las últimas 16 horas de cultivo. Las células fueron recolectadas automáticamente y la radiactividad medida en un contador β directo MATRIX 96 (Packard Instrument Co, Mariden, CO., USA.). La viabilidad celular (>90%) fue determinada por recuento directo en microscopio óptico de las células teñidas con azul tripán.

En algunos experimentos, los linfocitos T del LS fueron separados en células CD69⁺ y CD69⁻ antes de realizar los ensayos de proliferación, utilizando una selección positiva y negativa respectivamente con bolas magnéticas con IgG anti-ratón conjugadas con AcM anti-CD69 (TP 1/55) mediante el procedimiento explicado más arriba. En otros experimentos, los linfocitos T del LS se mantuvieron en cultivo durante 5 días en MFC con o sin rIL-2 (10 UI/mL) antes de realizar los ensayos de proliferación ya descritos.

6. Cinética de la expresión de CD25.

Los linfocitos T purificados de SP de pacientes con AR o controles y de LS de pacientes con AR fueron activados durante 160 horas en presencia de MFC solo, PMA (2 ng/mL) o PMA más AcM anti-CD69 (TP 1/8X, 250 mL/mL del sobrenadante del hibridoma). Tras repetidos lavados en PBS-BSA fueron incubadas durante 1 hora a 4°C con AcM anti-CD25 y anti-CD3 (Coulter), conjugados respectivamente con fícoeritroína y fluoresceína. Como controles se utilizaron AcM IgG de ratón del mismo isotipo y conjugados con los mismos marcadores. La expresión de CD25 fue valorada mediante citometría de flujo en diferentes momentos del cultivo (0, 18, 42, 66 y 160 horas). El resultado se expresa como el porcentaje de células positivas (\pm DE) para dicho AcM tras restar la fluorescencia de fondo obtenida con el anticuerpo control. La densidad en la superficie celular de CD25 fue analizada indirectamente calculando la IFM de las células analizadas. Los valores de la IFM para cada AcM se obtuvieron en una escala logarítmica y los datos se convirtieron a unidades lineales arbitrarias utilizando la formula descrita más arriba.

7. Producción de IL-2.

La producción de IL-2 fue analizada en un bioensayo como la proliferación de la línea celular CTLL-2. Esta línea celular crece en función de la IL-2 presente en el medio. Para el experimento se utilizaron los sobrenadantes correspondientes a las 66 horas de los cultivos celulares activados con MFC solo, PMA (2 ng/mL) o PMA más AcM anti-CD69 del apartado anterior. Se añadieron varias diluciones de rIL-2 y de los sobrenadantes a un cultivo de 5000 células CTLL-2 durante 24 horas, las últimas seis en presencia de 1 μ Ci de [³H]TdR. Las células fueron recolectadas y se cuantificó la radiactividad en un contador β directo MATRIX 96. La producción de IL-2 correspondiente a cada sobrenadante fue calculada por comparación con la curva obtenida con la rIL-2 utilizando para

ello un programa de regresión lineal.

8. Análisis estadístico.

Todos los resultados se expresan como la media \pm DE o como mediana [percentiles 25-75%]. Se testó la normalidad de las variables analizadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnof. En el caso de variables normales se utilizó la t de Student para muestras pareadas y no pareadas. En el resto de casos se utilizaron los test no paramétricos de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis en las condiciones apropiadas.

VI. RESULTADOS

1. Expresión de CD69 en el LS.

Se obtuvieron células E⁺ de LS y SP de pacientes con AR y se analizó la expresión de CD69 en superficie con un doble marcaje (CD3/CD69) mediante citometría de flujo.

La expresión de CD69 en las células T (CD3⁺) de LS fue de un $64.3 \pm 8.1\%$ frente a un $5.81 \pm 2.6\%$ en las células T de SP de los mismos pacientes ($P < 0.001$, figura VI.1). La expresión de CD69 fue siempre superior

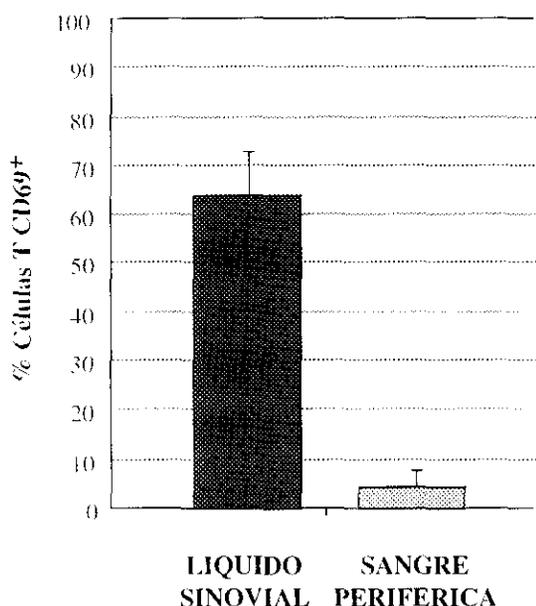


Figura VI.1: Expresión de CD69 en linfocitos T de líquido sinovial y sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide. Las células T de LS o SP fueron obtenidas tras roseteo de las células mononucleares de LS o SP (LLS o LSP) con hemáties de carnero tratados con neuraminidasa (N-HC) tal y como se describe en la sección de Material y Métodos. La expresión de CD69 en la superficie de las células E⁺ fue analizada mediante citometría de flujo con doble marcaje CD3/CD69. Los resultados representan el porcentaje de células CD3⁺ que expresaban también en superficie el marcador de activación CD69 tras restar la fluorescencia de fondo obtenida con dos AcM irrelevantes control del mismo isotipo. Los resultados se expresan como la media ± DE.

en las células T de LS que en las células T de SP para cada muestra pareada. La IFM con que se expresaba CD69 fue también mayor en LS (1.14 ± 0.8) que en SP (1.07 ± 0.3 , $P < 0.05$). La alta expresión de CD69 en las células T de LS no se debió a una activación de las mismas durante el proceso de separación (por el entrecruzamiento de las moléculas CD2 durante el roseteo), ya que se observaron los mismos resultados en experimentos de doble marcaje

realizados con células mononucleares de LS no separadas previamente (datos no mostrados). En la figura VI.2. se muestra una tinción representativa.

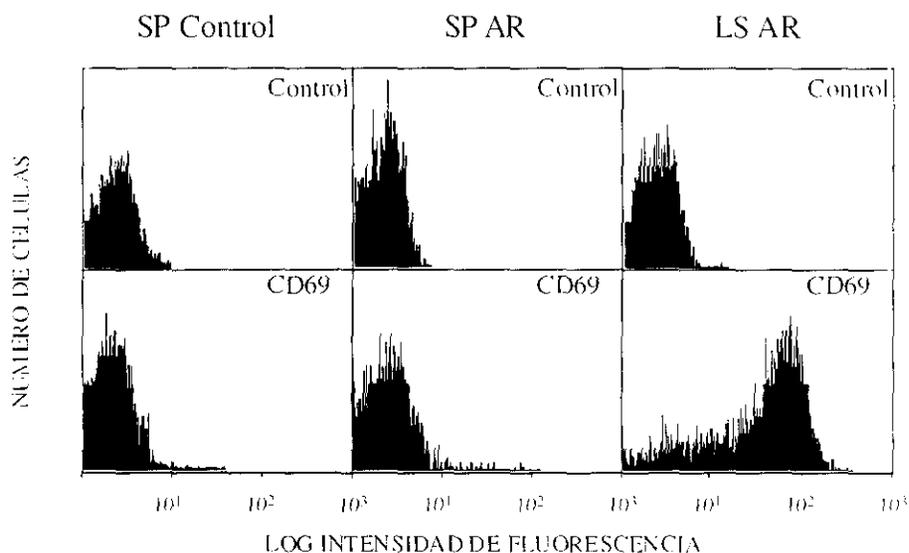


Figura VI.2: Expresión de CD69 en linfocitos T de líquido sinovial. En esta figura se muestra un ejemplo representativo de la expresión de CD69 en células mononucleares de SP de un control y células mononucleares no estimuladas de SP y LS de un paciente con AR.

Se intentó correlacionar la expresión de CD69 con diferentes variables clínicas y de tratamiento, sin que se observara ninguna relación con la edad, el sexo, la duración media de la enfermedad, la positividad para el FR, el recuento articular, diversos índices funcionales o el tratamiento con diferentes fármacos modificadores de la enfermedad.

2. Expresión de otros marcadores celulares en LS y SP.

Se analizó la expresión de otros marcadores celulares de superficie de linfocitos T. Para ello se obtuvieron muestras pareadas de LS y SP en fresco de pacientes con AR y, tras su separación con hematíes de carnero tratados con neuraminidasa, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de CD3, CD4, CD8, CD25 y HLA-DR. La distribución de estos Ag de superficie fue similar a la ya descrita en la literatura (Figura VI.3).

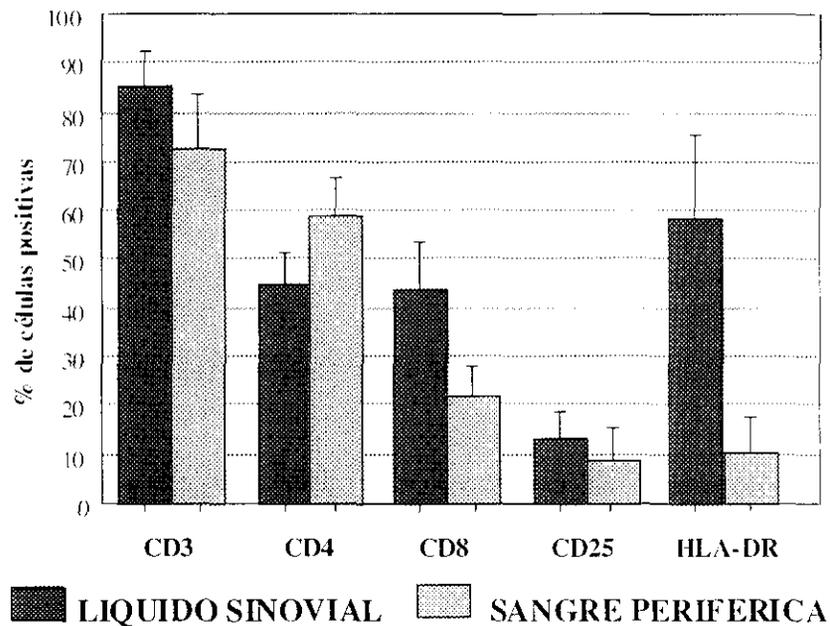


Figura VI.3: Análisis del fenotipo de las células T del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Las células T de LS fueron obtenidas tras roseteo de las células mononucleares de LS con hematíes de carnero tratados con neuraminidasa (N-HC) tal y como se describe en la sección de Material y Métodos. Las células E⁺ fueron marcadas con AcM anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 o anti-HLA-DR seguido de una incubación con fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fluoresceína. Como controles se utilizaron AcM irrelevantes de ratón del mismo isotipo. El análisis se realizó mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas (± DE) para cada AcM tras restar la fluorescencia de fondo obtenida con el Ac control.

Así, el 86±9.5% de las células E⁺ del LS y el 73.3±9.8 de las células E⁺ de SP fueron CD3⁺; el 45.1±9% de las células E⁺ de LS y el 59.8±6.3% de las células E⁺ de SP fueron CD4⁺; el 44.2±13.7% de las células E⁺ de LS y el 22.1±5.3% de las células E⁺ de SP fueron CD8⁺; el 13.5±7.6% de las células E⁺ de LS y el 9.5±5.3% de las células E⁺ de SP expresaban CD25, mientras el 59.2±12.9% de las células E⁺ de LS y el 10.8±5.4% de las células E⁺ de SP expresaban HLA-DR en su superficie.

De estos resultados se desprenden dos conclusiones importantes. En primer lugar, como ya ha sido descrito por algunos autores, la proporción de células CD8 fue muy superior en LS cuando se comparó con la observada en SP de los mismos pacientes (cociente CD4/CD8 1.02±0.6 en LS y 2.7±1.1 en SP, P≤0.001). En segundo término, la alta expresión de CD69, un marcador de activación celular que aparece inmediatamente después de la activación en la

superficie de las células T de LS, está en consonancia con la alta expresión de antígenos de activación tardíos como HLA-DR y contrasta con la existencia de una expresión relativamente baja de antígenos de activación precoces como CD25.

3. Fenotipo de las células CD69⁺ presentes en el LS.

Para caracterizar mejor las células T CD69⁺ presentes en el LS de los pacientes con AR, se obtuvieron células mononucleares de LS y, tras su separación mediante roseteo con hematíes de carnero tratados con neuraminidasa, se analizó su fenotipo a través de un doble marcaje con CD69 y otros marcadores de superficie.

Como se muestra en la figura VI.4, tanto la población CD69⁺ (83.6±12.6%) como la CD69⁻ (86.5±7%) eran mayoritariamente CD3⁺. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la distribución de los marcadores CD4 y CD8. De esta forma, las células CD69⁺ eran predominantemente CD8⁺ (49.6±19.2% CD8⁺ frente a un 34.2±11.4% CD4⁺, $P<0.03$), mientras las células CD69⁻ eran predominantemente CD4⁺ (60.3±10.2% CD4⁺ frente a un 26.1±15% CD8⁺, $P<0.0001$). El cociente CD4/CD8 fue también significativamente menor en las células CD69⁺ (0.7±0.4) que en las CD69⁻ (1.9±1.1, $P<0.002$).

Cuando se analizó la expresión de CD25, también se encontraron diferencias entre ambas poblaciones, siendo el 11.5±6.6% de las células CD69⁺ positivas para CD25 en comparación con el 18.7±8.6% de las células CD69⁻ ($P<0.005$). No hubo ninguna diferencia en la expresión de HLA-DR (58.2±14.1% en la población CD69⁺ y 62.2±9% en la población CD69⁻).

De estos experimentos se puede concluir que la población CD69⁺ está constituida sobre todo por células CD3⁺ que expresan predominantemente,

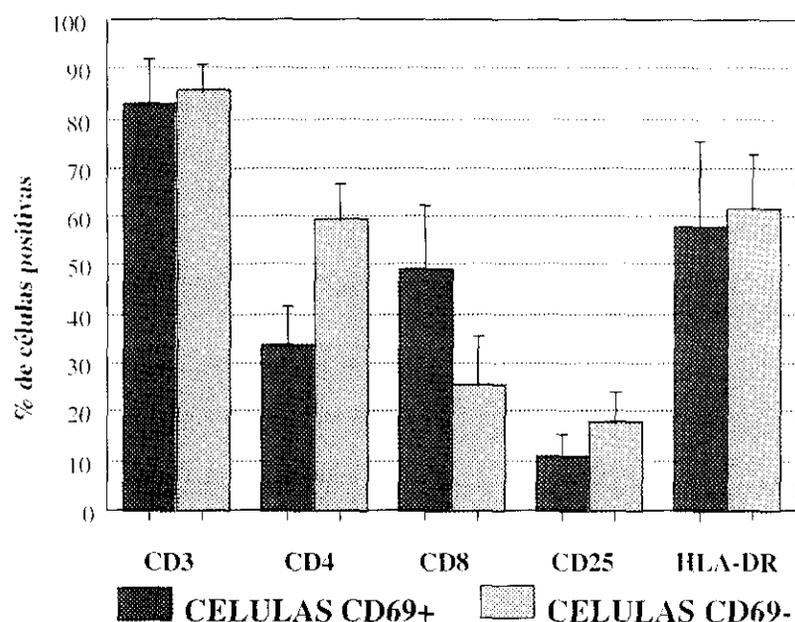


Figura VI.4: Análisis del fenotipo de las células T CD69+ del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Las células T de LS fueron obtenidas tras roseteo de las células mononucleares de LS con hematies de carnero tratados con neuraminidasa (N-HC) tal y como se describe en la sección de Material y Métodos. Las células E+ fueron marcadas con AcM anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 o anti-HLA-DR seguido de una incubación con fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugados con fluoresceína. Tras esto, las células se incubaron con suero normal de ratón. Como tercer Ac se utilizó un AcM anti-CD69 biotinado que fue revelado con ficocitrofina al 10%. Como controles se utilizaron AcM irrelevantes de ratón del mismo isotipo. El análisis se realizó mediante citometría de flujo y se examinaron los porcentajes relativos de CD3, CD4, CD8, CD25 y HLA-DR dentro de las poblaciones CD69+ y CD69- de los linfocitos T del LS. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas (\pm DE) para cada AcM tras restar la fluorescencia de fondo obtenida con el Ac control.

aunque no exclusivamente, el marcador CD8. Se observó también una mayor tendencia de estas células recientemente activadas a expresar en menor proporción el marcador de activación CD25.

4. Regulación de la expresión de CD69 en las células T de LS.

Como se ha comentado previamente, la molécula CD69 desaparece rápidamente de la superficie de las células T después de la activación *in vitro* con diferentes estímulos (aproximadamente en 48-72 horas). Sin embargo, la expresión de CD69 en un alto porcentaje y con una alta IFM en las células T de LS de AR es bastante constante, lo que sugiere que estas células están sometidas de forma persistente a estímulos activadores dentro de la

articulación.

Con el objetivo de analizar los factores implicados en esta expresión mantenida de CD69 en el LS de la AR, se purificaron células T de LS y se cultivaron durante 120 horas en solitario o mezcladas en una proporción 1/1 con células no T autólogas de LS. Esta población de células no T de LS se compone esencialmente de células B, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células de la capa bordeante sinovial. Se analizó la expresión de CD69 en las células T por citometría de flujo a las 18, 72 y 120 horas del cultivo. Como control se procesaron en paralelo LSP sin separar del mismo paciente que habían sido previamente estimulados con AcM anti-CD3 durante 18 horas para inducir la expresión de CD69 en superficie.

La expresión media (\pm DE) de CD69 a las 18 horas de cultivo fue de un $44.6\pm 5.1\%$ en las células T de LS, de un $46.6\pm 4.7\%$ en la mezcla de células T y no T de LS, y de un $63\pm 8.2\%$ en los LSP sin separar. Considerando como el 100% de la expresión de CD69 la observada a las 18 horas de cultivo, un $59.5\pm 22.6\%$ de las células T de SP, un $72.1\pm 21.7\%$ de las células T purificadas del LS cultivadas en solitario y un $71.5\pm 13.8\%$ de las células T co-cultivadas con células no T continuaban expresando CD69 a las 72 horas (diferencias no significativas, figura VI.5).

A las 120 horas de cultivo, la expresión de CD69 fue sólo del $14\pm 12.1\%$ en las células T de SP y del $38.4\pm 19\%$ en las células T del LS cultivadas en solitario, mientras las células T co-cultivadas con células no T mantenían el $70.6\pm 22.9\%$ de la expresión basal de CD69 ($P < 0.006$ y 0.004 respectivamente). Es decir, tanto las células T de LS cultivadas en solitario como las células T de SP previamente activadas en presencia de células no T de SP modularon la molécula CD69 de su superficie al cabo de 120 horas. Este es un hecho esperable, ya que la molécula CD69 se modula de la superficie celular en ausencia de un estímulo persistente. Sin embargo, las células T de LS en presencia de células no T del mismo LS retenían una

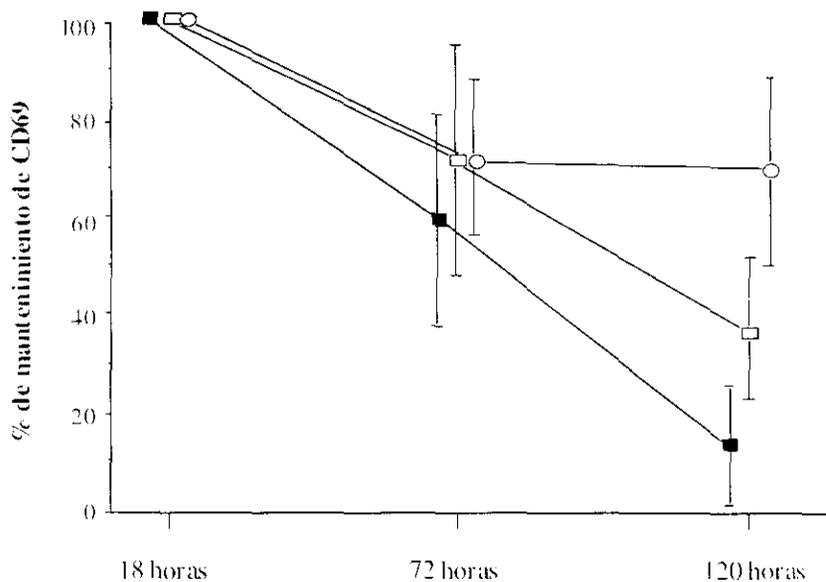


Figura VI.5. Mantenimiento de la expresión de CD69 en las células T del líquido sinovial de artritis reumatoide. Las células T de LS fueron aisladas y cultivadas durante 120 horas en solitario (cuadrados blancos) o mezcladas en una proporción 1/1 con células autólogas no T de LS (círculos). LSP de pacientes con AR fueron estimuladas durante 18 horas con AcM anti-CD3 (50 ng/mL) y entonces cultivadas en paralelo (cuadrados negros). Se midió la expresión de CD69 mediante citometría de flujo a las 18, 72 y 120 horas del cultivo. La expresión de CD69 a las 18 horas fue considerada como el 100% de expresión. La expresión media de CD69 en ese momento era 44.6% en células T de LS, 46.6% en la mezcla de células T y no T de LS, y 63% en LSP. Los resultados representan la media de 14 experimentos representativos y se expresan como el porcentaje medio \pm DE) de mantenimiento de CD69 comparada con la expresión a las 18 horas.

expresión significativa de CD69 en su superficie a las 120 horas de cultivo. Este hecho sugiere que un estímulo activador mediado a través de las células no T de LS es, al menos en parte, el responsable del mantenimiento de una alta expresión de CD69 por parte de los linfocitos T del LS de pacientes con AR.

Para observar el efecto que suponía la adición de células no T de LS no ya desde el principio del cultivo, sino varias horas después, se realizó el siguiente experimento. Por un lado, se aislaron y cultivaron en solitario células T de LS de pacientes con AR durante 120 horas. A una parte de estas células se le añadieron células autólogas no T de LS en una proporción 1/1 a las 72 horas del cultivo. Se cultivaron en paralelo linfocitos de líquido sinovial (LLS) sin separar como control.

La expresión de CD69 a las 18 horas del cultivo era de un 50% en las células T de LS y de un 54.9% en los LLS sin separar. Como se observa en la figura VI.6, la expresión de CD69 en superficie disminuyó establemente en las células T cultivadas en solitario, mientras que cuando los LLS fueron cultivados sin separar o a las células T se añadieron células no T autólogas a las 72 horas del cultivo, la expresión de CD69 no sólo no disminuyó a partir de las 72 horas, sino que incluso aumentó por encima de la expresión basal.

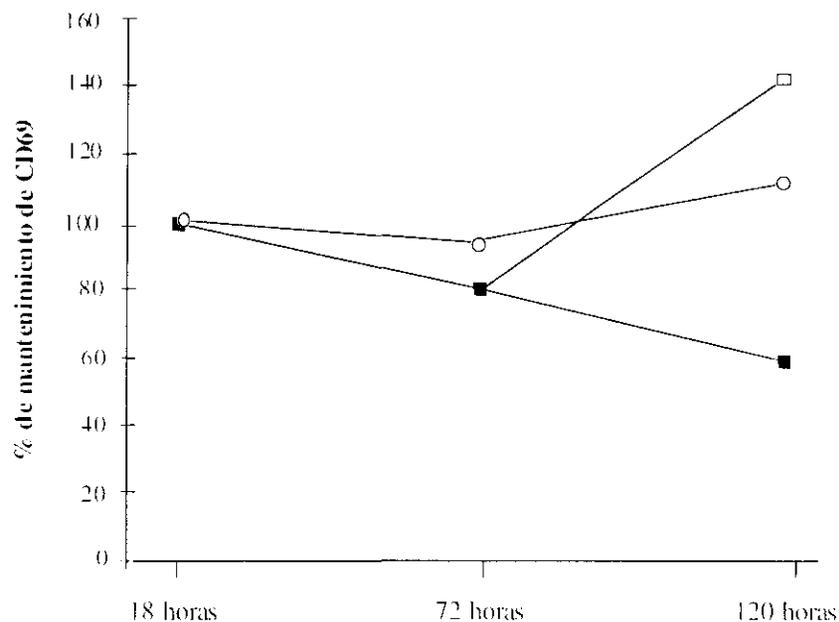


Figura VI.6. La adición de células no T de líquido sinovial al cultivo de células T de líquido sinovial impide la disminución de la expresión de CD69. Las células T de LS fueron aisladas y cultivadas durante 120 horas en solitario (cuadrados negros) o mezcladas en una proporción 1/1 con células autólogas no T de LS añadidas a las 72 horas (cuadrados blancos). Se cultivaron en paralelo linfocitos de líquido sinovial (LLS) sin separar (círculos). La expresión de CD69 fue valorada mediante citometría de flujo a las 18, 72 y 120 horas del cultivo. La expresión de CD69 a las 18 horas fue considerada como el 100% de expresión. La expresión media de CD69 en ese momento era 50% en células T de LS y 54.9% en los LLS sin separar. Los resultados se expresan como el porcentaje de mantenimiento de CD69 comparada con la expresión a las 18 horas.

Estos resultados indican que la expresión mantenida de CD69 en las células T de LS depende de la presencia de células no T de LS. Una proporción de 1/10 de células no T de LS fue capaz de mantener la expresión de CD69 en células T de LS en los mismos niveles que una proporción 1/1. Hay que destacar también que, en pacientes con una alta expresión basal de CD69 en linfocitos T de SP *in vivo*, la molécula era modulada de la superficie celular *in vitro* aún en presencia de células no T autólogas de SP, sugiriendo

que se trata de un fenómeno específico de las células no T del LS (datos no mostrados).

5. Mecanismo de mantenimiento de la expresión de CD69.

El mantenimiento y/o inducción de la expresión de CD69 en los linfocitos T de LS podría depender de interacciones celulares directas o de la producción de factores solubles por parte de las células no T. Para clarificar los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la expresión sostenida de CD69 en la superficie de las células T del LS se diseñaron varios experimentos.

En primer lugar se analizó la capacidad de cinco sobrenadantes de cultivos celulares de células T y no T de LS de pacientes con AR para mantener la expresión de CD69 en cultivos de linfocitos T purificados de los mismos pacientes (en una proporción 1/1 volumen). En todos los casos, los

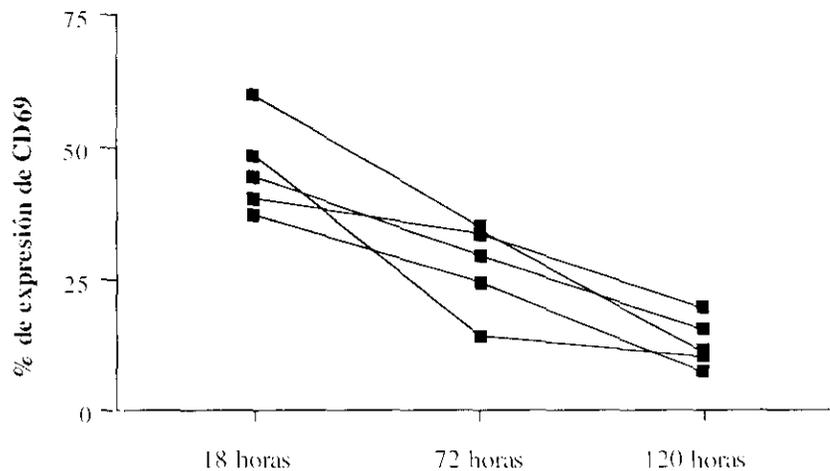


Figura VI.7. El mantenimiento de la expresión de CD69 no depende de factores solubles. Se realizaron cultivos de linfocitos T purificados de pacientes con AR a los que se añadieron los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T y no T de LS que mantenían una alta expresión de CD69 (en una proporción 1/1 volumen). La expresión de CD69 fue valorada mediante citometría de flujo a las 18, 72 y 120 horas del cultivo. La expresión de CD69 a las 18 horas fue considerada como el 100% de expresión. Los resultados se expresan como el porcentaje de mantenimiento de CD69 comparada con la expresión a las 18 horas.

sobrenadantes procedían de cultivos en los que se mantenía una alta expresión de CD69. Se observó que al añadir estos sobrenadantes no se mantenía ni se incrementaba la expresión de CD69 en células T autólogas de LS en ningún momento del cultivo (figura VI.7).

Se cultivaron entonces linfocitos T de LS de pacientes con AR en presencia de células no T de LS autólogas sin modificar o previamente tratadas con paraformaldehído (PF). El PF evita la liberación de factores solubles por parte de las células pero permite las interacciones entre moléculas expresadas en la superficie. Se analizó la expresión de CD69 en las células T por citometría de flujo a las 18 y 72 horas del cultivo. La expresión de CD69 a las 18 horas fue considerada como el 100% de expresión.

La expresión media de CD69 a las 18 horas era de un 47.6% en células T de LS, de un 41.4% en la mezcla de células T y no T, de un 42% en la mezcla de células T y no T PF y de un 41.1% en la mezcla de células T y no T PF o no. Como se muestra en la figura VI.7, tanto las células no T de LS sin modificar, las células no T previamente PF y una mezcla (1/1) de ambas eran capaces de mantener significativamente la expresión de CD69 (90.2%, 78% y 65.8% respectivamente) en las células T de LS a las 72 horas en comparación con las células T cultivadas en solitario (14.8%).

Paralelamente, se preincubaron por separado las células T y no T de LS con un AcM anti-CD18 (dirigido contra la cadena común $\beta 2$ de las integrinas) con el objetivo de bloquear prácticamente todas las interacciones celulares directas. El resultado (figura VI.8) fue una inhibición significativa de la expresión de CD69 a las 72 horas (12.1%) similar a la observada cuando las células T de LS se cultivaron en solitario (la expresión de CD69 a las 18 horas fue de un 42.6% en este grupo de células).

En conjunto, estos resultados sugieren que el mecanismo responsable del mantenimiento de la expresión de CD69 en las células T de LS está en

relación con interacciones directas entre células T y no T de LS.

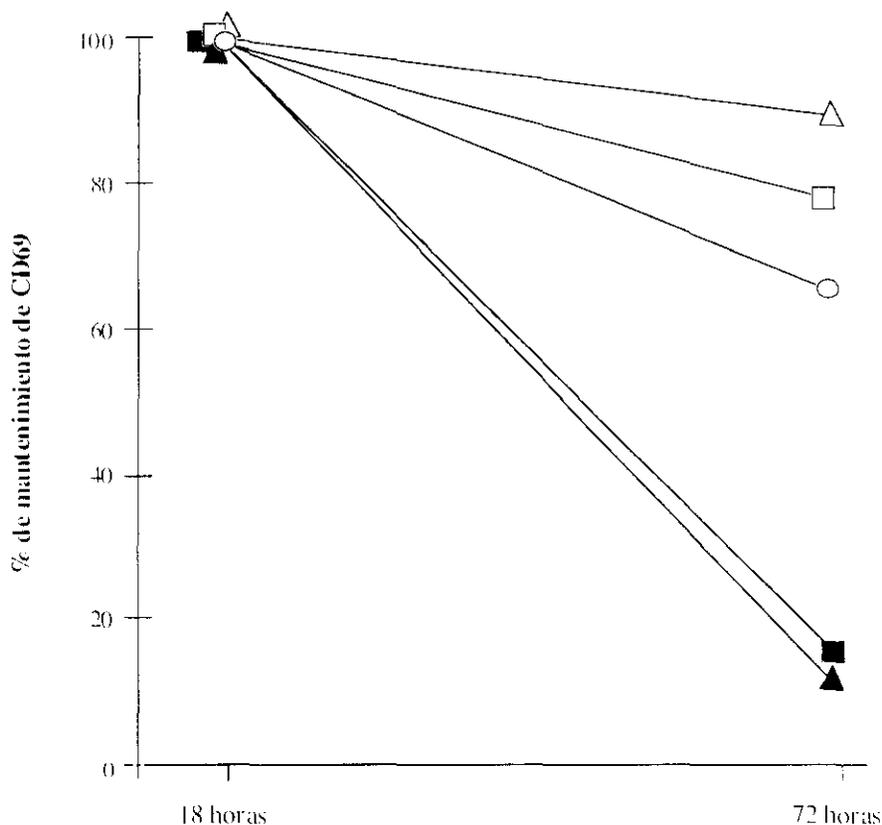


Figura VI.8. La expresión de CD69 en células T de líquido sinovial depende de mecanismos de contacto directo con células no T. Las células T de LS fueron aisladas y cultivadas durante 72 horas en solitario (cuadrados negros) o mezcladas en una proporción 1/1 con (a) células autólogas no T de LS (triángulos blancos), (b) células autólogas no T previamente tratadas con paraformaldehído (PF) (cuadrados blancos), (c) una mezcla de células autólogas no T paraformaldehizadas o no (círculos). En algunos experimentos las células T y no T de LS fueron preincubadas por separado con un AcM anti-CD18 durante 15 minutos a 4 °C antes de ser mezcladas en una proporción 1/1 (triángulos negros). Se analizó la expresión de CD69 mediante citometría de flujo a las 18 y 72 horas. La expresión de CD69 a las 18 horas fue considerada como el 100% de expresión. La expresión media de CD69 en ese momento era 47,6% en células T de LS, 41,4% en la mezcla de células T y no T, 42% en la mezcla de células T y no T PF, 41,1% en la mezcla de células T y no T PF o no, y 42,6% en las células pretratadas con anti-CD18. Los resultados se expresan como el porcentaje de mantenimiento de CD69 comparada con la expresión a las 18 horas.

6. Inducción de CD69 en los linfocitos T de SP.

Como se mostró en la figura VI.6, al añadir a las 72 horas células no T de LS a un cultivo de células T de LS no sólo se mantenía la expresión de CD69 sino que se incrementaba. Para determinar si las células no T de LS podían también inducir la expresión de CD69 en células T de SP de pacientes

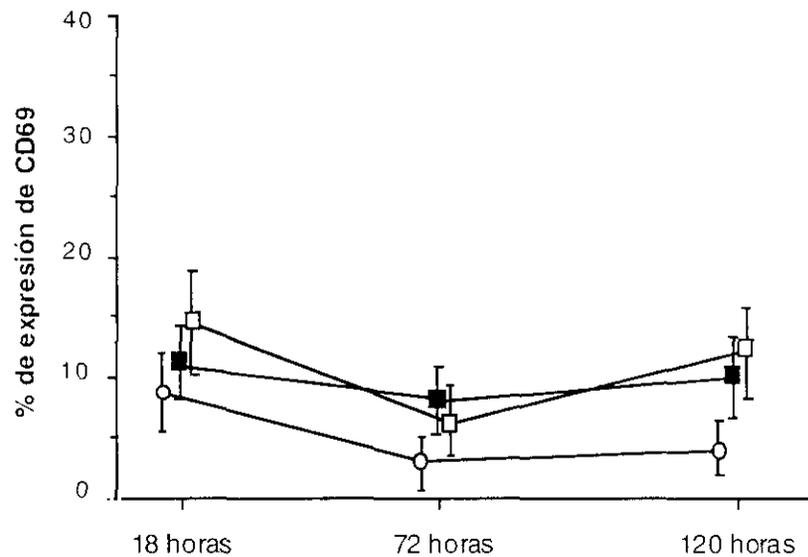


Figura VI.9: Inducción de CD69 en células T de sangre periférica de artritis reumatoide por las células no T de líquido sinovial. Las células T de SP fueron aisladas y cultivadas durante 120 horas mezcladas en una proporción 1/1 con células autólogas no T de SP (círculo), células autólogas no T de LS (cuadrados blancos) o células autólogas no T de LS previamente tratadas con paraformaldehído (cuadrados negros). La expresión de CD69 fue valorada mediante citometría de flujo a las 18, 72 y 120 horas del cultivo. Los resultados se expresan como el porcentaje medio (\pm DE) de expresión de CD69.

con AR se realizaron varios experimentos en los que células T purificadas de SP de AR fueron cultivadas en solitario o en presencia de células no T de LS autólogas sin modificar o previamente PF. Como se ve en la figura VI.9, con ninguna de estas tres combinaciones se detectó la presencia de niveles significativos de CD69.

7. Funcionalidad vía CD69 de los linfocitos T de LS.

La molécula CD69 está involucrada en la activación celular T, ya que se pueden desencadenar respuestas proliferativas en estas células con AcM anti-CD69 en presencia de activadores de la PKC a dosis submitogénicas. Dado que CD69 se hiperexpresa en las células T de LS de AR, la inducción de proliferación celular por esta vía podría constituir una forma de expansión de una determinada población T dentro del microambiente sinovial. Para

investigar esta posibilidad estudiamos a continuación la capacidad de proliferar por esta vía de los linfocitos de SP de AR y controles y de LS de AR.

Para ello los LSP y los LLS fueron cultivados y activados en triplicado con diferentes combinaciones de forbol miristato acetato (PMA), IL-2 recombinante humana (rIL-2), AcM anti-CD69 TP 1/8X, AcM anti CD28 o AcM anti-CD3 durante 72 horas. La proliferación celular fue estimada como la incorporación de timidina triada ($[^3\text{H}]\text{TdR}$) durante las 16 últimas horas del cultivo.

Proliferación sin coestímulo. Como se muestra en la figura VI.10a, los LLS de pacientes con AR no fueron capaces de proliferar cuando se estimularon solamente con AcM anti-CD69 (501 ± 326 cpm), a pesar de que esta molécula se encuentra presente en la superficie de un gran número de células T. Como ya se había descrito, tanto los LSP de controles (375 ± 157 cpm) como de AR (224 ± 130 cpm) tampoco proliferaron con AcM anti-CD69 sin activación concomitante de la PKC.

Proliferación con activación de la PKC. Sin embargo, aún en presencia de PMA la proliferación vía CD69 de los LLS de AR fue defectuosa (4099 ± 2857 cpm) cuando se comparó con los LSP de controles (21102 ± 1911 cpm, $P < 0.0001$) y AR (20314 ± 2005 cpm, $P < 0.0001$, figura VI.10b). La adición de IL-2 recombinante humana a los linfocitos cultivados con PMA y AcM anti-CD69 no corrigió completamente ninguno de estos defectos (LSP control: 26485 ± 3604 cpm; LSP AR: 21140 ± 2674 cpm; y LLS AR: 6843 ± 3250 cpm), sugiriendo que la baja secreción de esta linfoquina no es la única causa de la falta de respuesta proliferativa. La proliferación a través de la vía de coestimulación CD28 en presencia de PMA también fue defectuosa en los LLS (5810 ± 1710 cpm) en comparación con los LSP de los mismos pacientes (17595 ± 3334 cpm) o los LSP de controles (18947 ± 2531 cpm, $P \leq 0.01$). Tampoco en este caso, la adición de rIL-2 anuló o corrigió

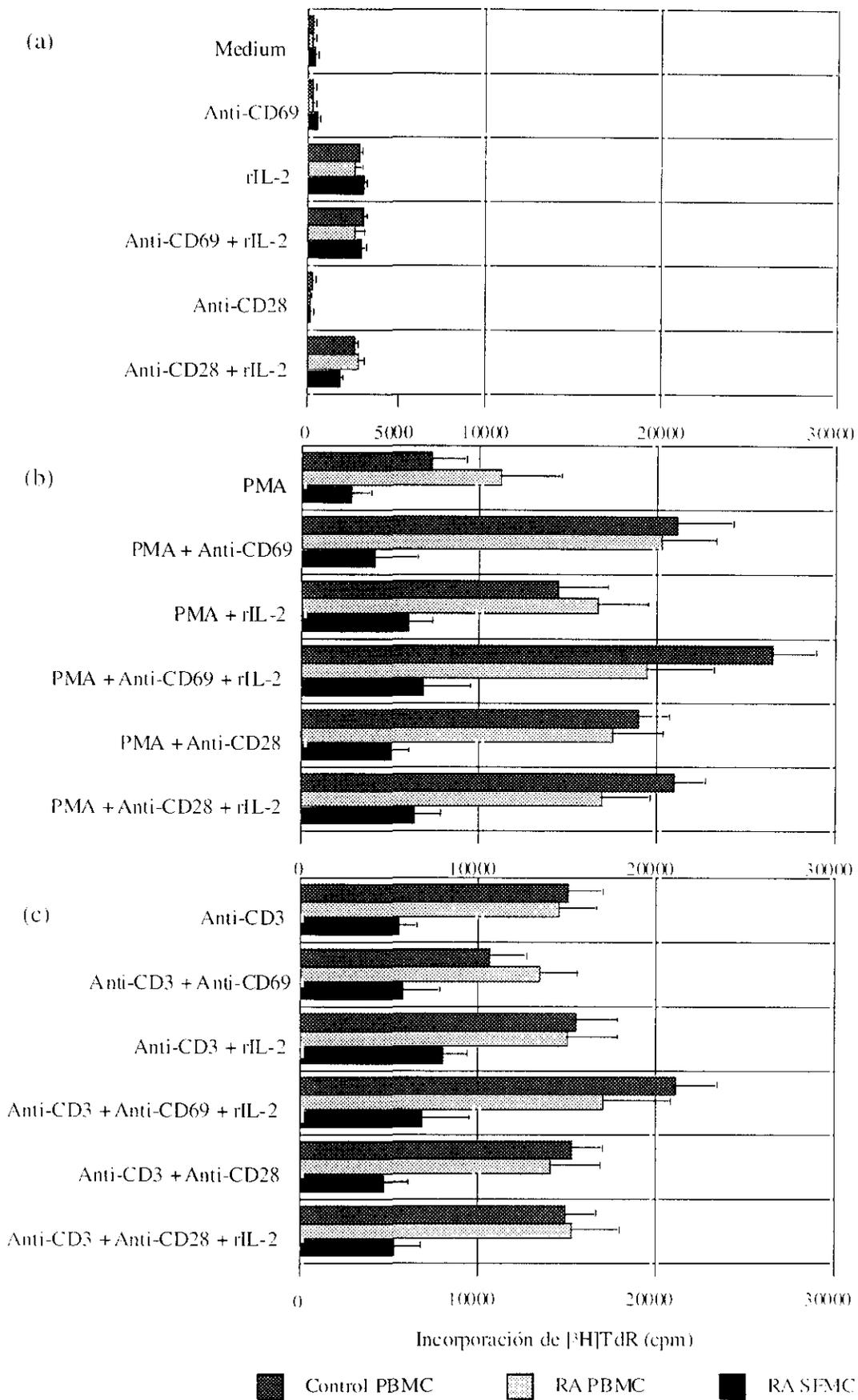


Figura VI.10. Respuestas proliferativas de los LSP de controles y LSP y LLS de pacientes con artritis reumatoide a diversos estímulos. Las células fueron cultivadas a una concentración de $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$ en MFC y activados en cultivos por triplicado. La proliferación celular fue estimada mediante la incorporación de [³H]TdR durante las últimas 16 horas de cultivo. Los resultados representan la media (\pm DE) de al menos 10 experimentos por grupo y se expresan como cuentas por minuto (cpm).

parcialmente este defecto. Las diferencias obtenidas no se explican por una expresión diferente de CD69 ó CD28 tras la estimulación con 2 ng/mL de PMA ya que ésta fue similar en los tres grupos cuando se valoró mediante citometría de flujo (datos no mostrados).

Proliferación con AcM anti-CD3. La proliferación de los LLS de AR también es defectuosa vía CD3 (figura VI.10c) [5887±3110 cpm en los LLS en comparación con 14331±3156 cpm en los LSP de pacientes y 14400±3612 cpm en los LSP de controles ($P \leq 0.0001$)], y la adición de un coestímulo con AcM anti-CD69 [5388±1456 cpm en los LLS en comparación con 13529±2132 cpm en los LSP de pacientes y 11534±1556 cpm en los LSP de controles ($P \leq 0.0001$)] o anti CD28 [4831±1201 cpm en los LLS en comparación con 15059±1074 cpm en los LSP de pacientes y 15285±980 cpm en los LSP de controles ($P \leq 0.0001$)] no corrige este defecto. De hecho, de forma constante pero difícil de interpretar, la proliferación inducida con AcM anti-CD3 y anti CD69 (figura VI.9c) fue prácticamente siempre menor que la inducida con AcM anti-CD3 solo tanto en LSP de controles como de AR. De nuevo, la adición de IL-2 recombinante humana no corrigió este defecto.

Por lo tanto, y a pesar de la alta expresión basal, la molécula CD69 no parece estar involucrada en la mediación de señales proliferativas en los linfocitos T de LS de pacientes con AR. La proliferación también defectuosa a través de la vía de coestímulo CD28 sugiere que el deterioro del proceso de activación T en LS no puede ser atribuido a una única alteración funcional, y que los linfocitos T de LS presentan por algún motivo una profunda incapacidad para responder a diferentes tipos de estímulos.

Un dato relevante es que, aunque no se observaron diferencias entre los LSP de pacientes y controles cuando se proliferaron en presencia de PMA y AcM anti-CD69 o anti-CD28, los LSP de pacientes con AR también mostraron una respuesta parcialmente defectuosa a la estimulación cuando se añadió rIL-2 (19503±1736 cpm frente a 26485±2127 cpm, $P \leq 0.05$ con PMA

más AcM anti-CD69; 16999 ± 1374 cpm frente a 20961 ± 1256 cpm. $P \leq 0.05$ con PMA más AcM anti-CD28).

8. Expresión de CD25 tras estímulo vía CD69.

La proliferación inducida en células T tras estimular vía CD69 depende de la producción de IL-2 y de la expresión de CD25 (cadena α del receptor de IL-2). Por lo tanto estudiamos a continuación la expresión de CD25 tras activar con dosis submitogénicas de PMA y AcM anti-CD69 en células T purificadas de LS y SP de pacientes y controles. Para ello las células T fueron cultivadas durante 160 horas en presencia de medio de cultivo, PMA (2 ng/mL) o PMA más AcM anti-CD69 (TP 1/8X, 10 μ g/mL). Los linfocitos fueron doblemente marcados con AcM anti-CD25 y anti-CD3, y su expresión se valoró mediante citometría de flujo a diferentes momentos del cultivo (0, 18, 42, 66 y 160 horas).

Las células T no estimuladas de LS mostraron una expresión basal aumentada de CD25 en su superficie ($21.2 \pm 12.3\%$) cuando se compararon con los linfocitos T de SP de los controles ($1.8 \pm 0.9\%$) o los pacientes con AR ($4.8 \pm 3.3\%$) (figura VI.11a). Cuando las células se estimularon con PMA, sólo se observó un modulación de la molécula CD3 en superficie y un aumento de la expresión de CD25 en los tres grupos, sin que existieran diferencias significativas ni en el porcentaje ni en la IFM en ningún momento del cultivo (Figura VI.11b).

El efecto de la estimulación con PMA más AcM anti-CD69 en células T de SP de los controles fue una expresión prolongada y aumentada de CD25 en su superficie, que alcanzó el máximo entre las 42 y las 66 horas del cultivo tanto en porcentaje ($92.5 \pm 5.5\%$) como en IFM (1.48 ± 0.5). A partir de entonces, la expresión de CD25 disminuyó progresivamente pero aún se mantenía una considerable expresión a las 160 horas (Figura VI.11c) en comparación con la activación sólo con PMA. Los linfocitos T de SP de

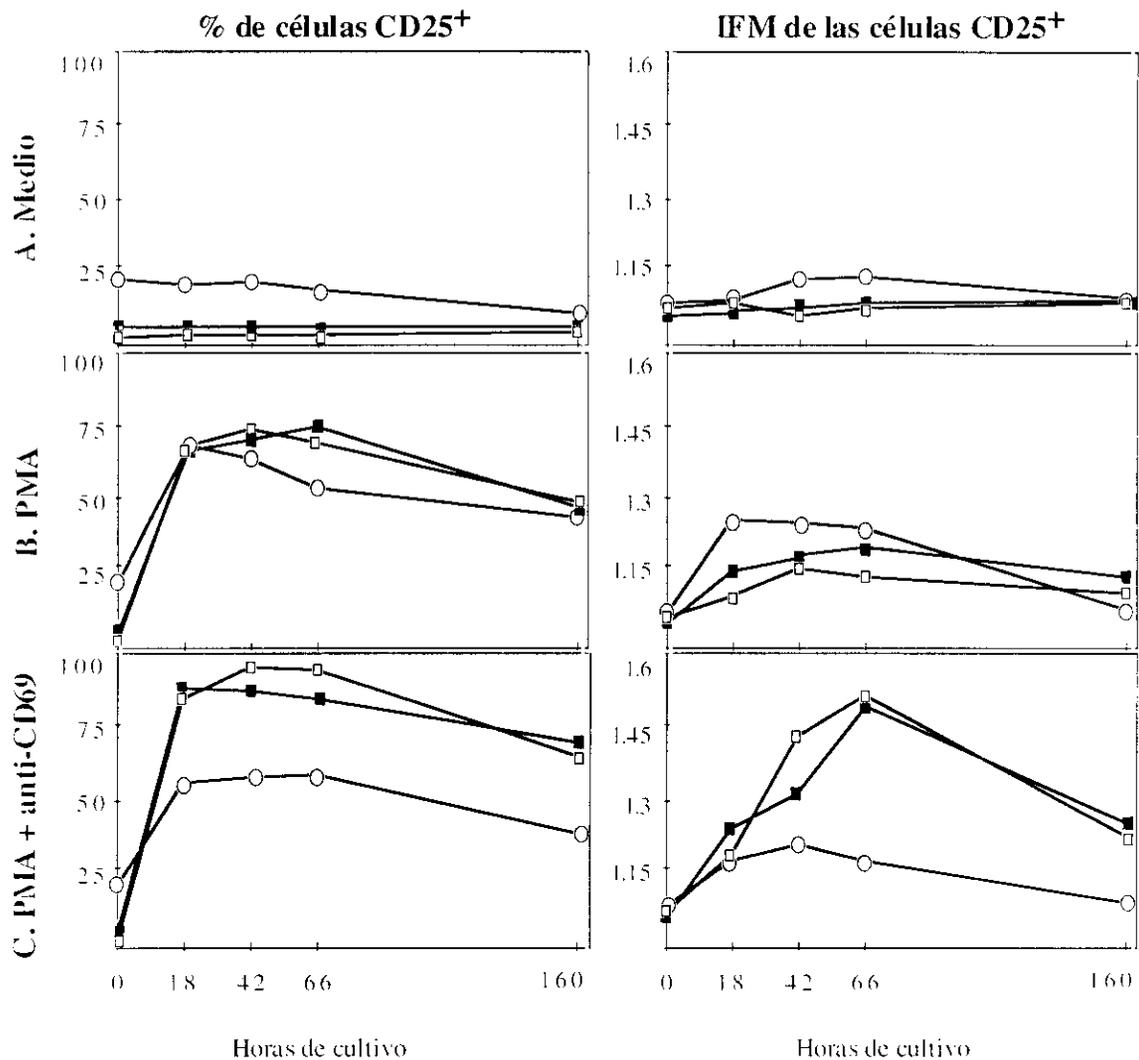


Figura VI. 10. Cinética de expresión de CD25 en los linfocitos T de sangre periférica de controles y los linfocitos T de sangre periférica y líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide vía CD69. Los linfocitos T purificados de SP de controles y SP y LS de pacientes con AR fueron cultivados durante 160 horas en presencia de MFC sólo (a), PMA (2 ng/mL) (b) o PMA más AcM anti-CD69 (TP 1/8X) (c). Las células fueron marcadas con AcM anti-CD25 y anti-CD3 y su expresión fue valorada mediante citometría de flujo en diferentes momentos del cultivo (0, 18, 42, 66 y 160 horas). La IFM de las células positivas se expresa en unidades arbitrarias utilizando una escala logarítmica. Los resultados representan la media de 4 experimentos por grupo. Cuadrados blancos = Linfocitos T de SP de controles; Cuadrados negros = Linfocitos T de sangre periférica de pacientes con AR; Círculos = Linfocitos T de LS de pacientes con AR.

pacientes con AR mostraron una respuesta similar a la misma estimulación ($81.7 \pm 19.4\%$ y 1.46 ± 0.6 de IFM a las 66 horas).

Sin embargo, los linfocitos T de LS de AR no experimentaban esta respuesta aumentada y prolongada a la estimulación con PMA y AcM anti-CD69, y la expresión de CD25 fue similar a la encontrada tras activar sólo con PMA ($57.5 \pm 24.7\%$ CD25⁺ y 1.15 ± 0.3 de IFM a las 66 horas, $P < 0.05$ y

$P < 0.005$ respectivamente en comparación con los linfocitos T de SP de pacientes o controles respectivamente). En la figura VI.12. se muestra un ejemplo representativo de una tinción.

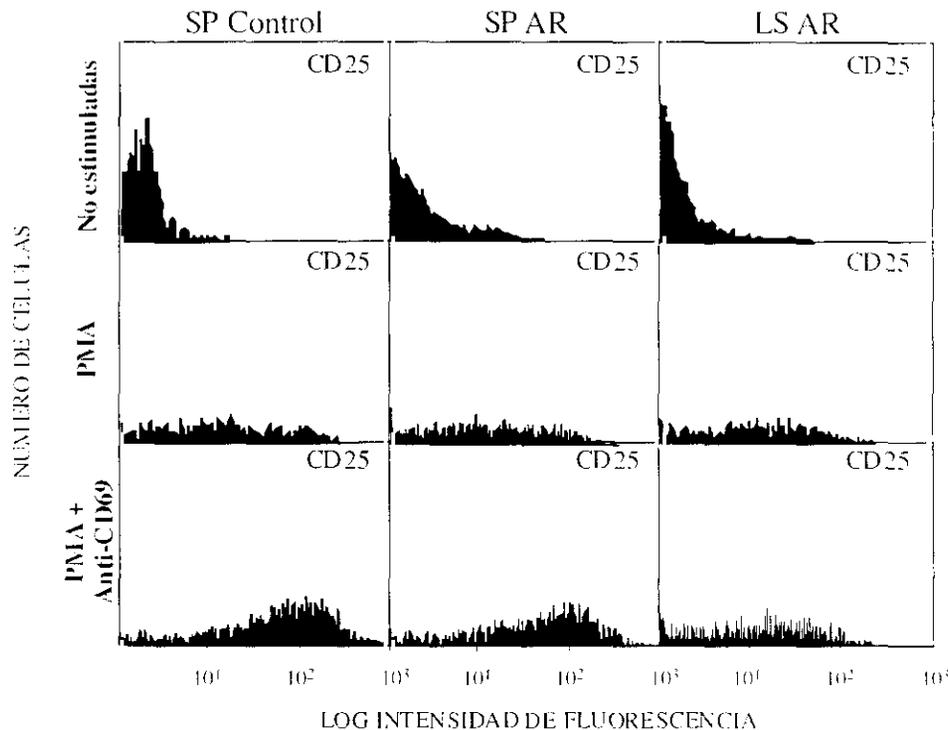


Figura VI.12. Expresión de CD25 en controles y artritis reumatoide tras activación con AcM anti-CD69. En esta figura se muestra la expresión de CD25 en linfocitos T de SP de un sujeto control y en linfocitos T de Sp y LS de un paciente con AR tras ser sometidas a diferentes estímulos y después de 66 horas de activación. Las células T fueron aisladas y cultivadas sin estimular, estimuladas con PMA o PMA más AcM anti-CD69.

Estos resultados indican que la proliferación defectuosa encontrada en los LLS de AR podría explicarse al menos por una defectuosa inducción de CD25 tras el estímulo vía CD69. Este defecto no fue observado en células T de SP de AR, sugiriendo que otro mecanismo podría ser el responsable de su proliferación parcialmente anormal.

9. Producción de IL-2 tras estímulo vía CD69.

Finalmente investigamos si una producción defectuosa de IL-2 también podría jugar un papel en el defecto funcional observado en células T de LS de AR y, parcialmente, también en SP de AR. Para ello se valoró la producción

de IL-2 por parte de los linfocitos T de SP de controles y AR y de LS de AR, utilizando los sobrenadantes a las 66 horas del experimento anterior, en un bioensayo como la proliferación de la línea CTLL-2 que crece exclusivamente en función de la IL-2 disponible en el medio.

Como se observa en la figura VI.13, los AcM anti-CD69 aumentaron apreciablemente la producción de IL-2 en las células T de SP de los controles a las 66 horas (18.25 ± 7 UI/mL con PMA más AcM anti-CD69 frente a 5.75 ± 3.5 UI/mL con PMA solo). Ni los linfocitos T de LS (1.5 ± 1.2 UI/mL con PMA más AcM anti-CD69 frente a 2.5 ± 1.1 UI/mL con PMA solo) ni los de SP de pacientes con AR (8.95 ± 0.8 UI/mL con PMA más AcM anti-CD69 frente a 9 ± 6.2 UI/mL con PMA solo) aumentaron su producción de IL-2 en

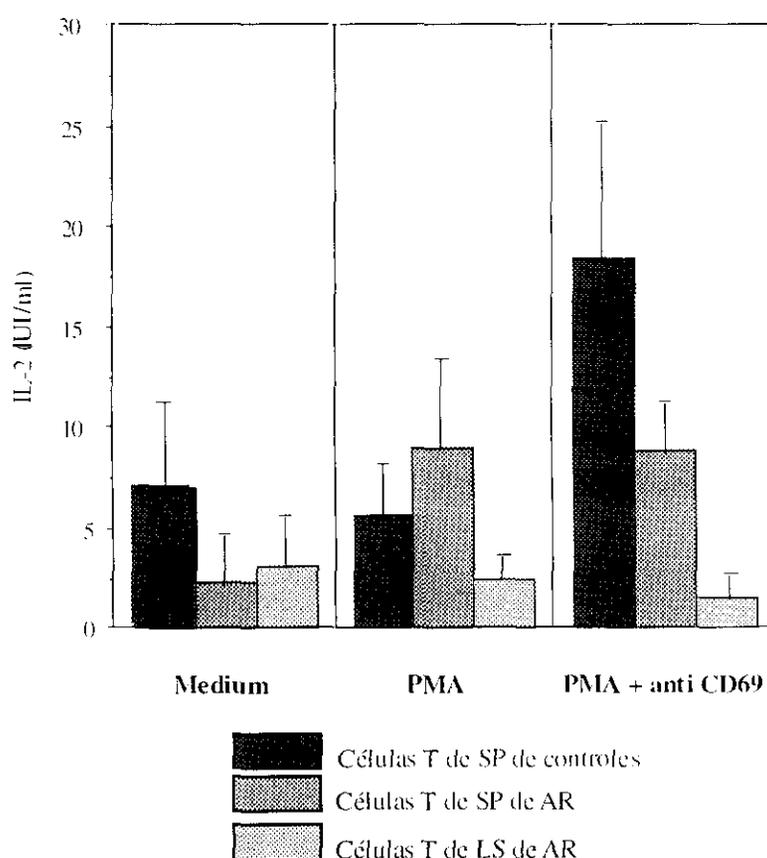


Figura VI.13. Producción de IL-2 por los linfocitos T de sangre periférica de controles y los linfocitos T de sangre periférica y líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide vía CD69. Los linfocitos T purificados de SP de controles y SP y LS de pacientes con AR fueron cultivados durante 160 horas en presencia de MFC sólo, PMA) o PMA más AcM anti-CD69. Los sobrenadantes fueron recogidos a las 66 horas y se analizó la producción de IL-2 en un bioensayo como la proliferación de la línea IL-2-dependiente CTLL-2. Los resultados representan la media (\pm DE) de 4 experimentos por grupo.

respuesta a la estimulación vía CD69. Estos resultados indican que la funcionalidad defectuosa vía CD69 puede ser explicada por unas deficientes expresión de CD25 y producción de IL-2 en linfocitos T de LS de AR y una anormal producción de IL-2 en linfocitos T de SP de AR.

10 Proliferación de los linfocitos T de LS CD69⁺ y CD69⁻.

CD69 se expresa transitoriamente en la superficie celular durante el proceso normal de activación del linfocito T. Como ya se ha comentado, la expresión de CD69 es bastante constante en los linfocitos T de LS de pacientes con AR y se mantiene por interacciones celulares directas entre los linfocitos T de LS y las células no T presentes en el mismo microambiente.

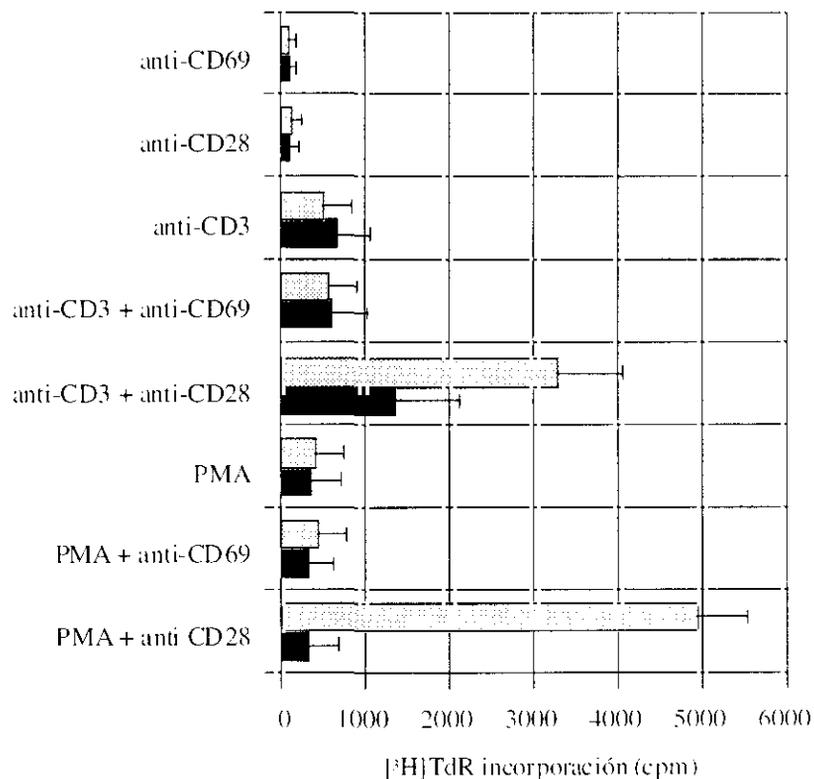


Figura VI.14. Proliferación de los linfocitos T de líquido sinovial CD69⁺ y CD69⁻. Se obtuvieron linfocitos T de LS de pacientes con AR CD69⁺ (barras negras) y CD69⁻ (barras grises) y se cultivaron a una concentración de 2×10^5 células/200 μ l en MFC. Las células fueron activadas por triplicado con diferentes combinaciones de PMA, AcM anti-CD3, anti-CD69, y anti-CD28. Se estimó la proliferación celular como la incorporación de [³H]TdR durante las últimas 16 horas de cultivo. Los resultados se expresan como cpm y representan la media \pm DE en tres sujetos.

Por lo tanto, CD69 puede ser considerado como el marcador de una población celular T recientemente activada que está sometida en la sinovial a una activación continua. Para analizar si las poblaciones de células T del LS CD69⁺ y CD69⁻ representan dos poblaciones funcionalmente distintas, se realizaron los siguientes experimentos (figura VI.14).

Se obtuvieron células T purificadas de LS CD69⁺ y CD69⁻ mediante selección positiva y negativa con bolas magnéticas respectivamente y fueron activadas por triplicado con diferentes combinaciones de PMA y AcM anti-CD3, anti-CD69 y anti-CD28.

Observamos que ambas poblaciones fueron incapaces de proliferar con AcM anti-CD69 sólo o en presencia de activación concomitante de la PKC con PMA. Sin embargo, los linfocitos T CD69⁻ mostraron una respuesta proliferativa significativamente mejor que las células T CD69⁺ cuando se activaron vía CD28 en presencia concomitante de estímulos mediados vía CD3 o PKC. Estos resultados indican que los linfocitos T de LS CD69⁺ y CD69⁻ exhiben diferentes respuestas a través de diferentes vías de coestímulo.

11. Proliferación de los linfocitos T de LS tras cultivo.

Se ha demostrado que las células T sometidas a activación continua entran en una fase reversible de incapacidad para responder a estímulos (anergia). Esto ocurre en situaciones fisiológicas en las que existe una alta exposición a Ag, como por ejemplo en los linfocitos de la lámina propia del intestino. Los linfocitos T obtenidos de la lámina propia intestinal comparten dos características con los linfocitos T de LS de pacientes con AR: una alta expresión de CD69 y una baja respuesta proliferativa ante diferentes estímulos. También se ha demostrado que en algunas enfermedades, como por ejemplo el LES, en las que los linfocitos están sometidos a un proceso de activación continuo y producen bajas cantidades de IL-2, estas células son capaces de aumentar su producción de IL-2 después de su "reposo" en cultivo

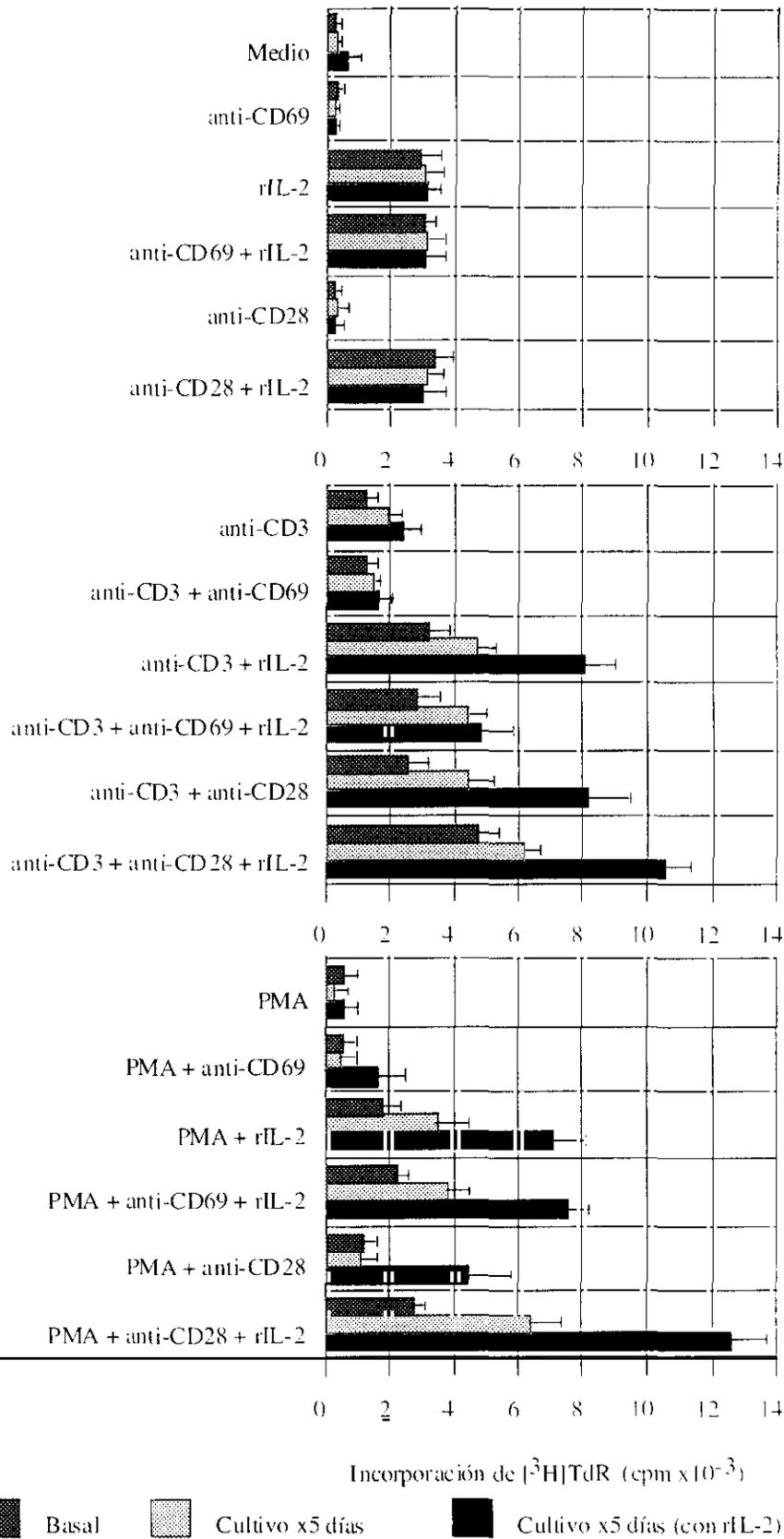


Figura VI.15. Proliferación de los linfocitos T de líquido sinovial tras "reposo". Se purificaron linfocitos T de LS de pacientes con AR y se cultivaron durante 5 días con o sin rIL-2. Se lavaron entonces las células repetidamente y se cultivaron a una concentración de 2×10^5 células/200 μ l en MFC. Las células fueron activadas por triplicado con diferentes combinaciones de PMA, rIL-2, AcM anti-CD3, anti-CD69, y anti-CD28. Se realizaron los mismos experimentos de proliferación con muestras pareadas de linfocitos T de LS obtenidos en fresco como control. Se estimó la proliferación celular como la incorporación de $[^3\text{H}]\text{TdR}$ durante las últimas 16 horas de cultivo. Los resultados se expresan como cpm y representan la media \pm DE en tres sujetos.

durante varios días.

Para analizar si la respuesta proliferativa defectuosa observada tras la activación a través de CD69 o CD28 en los linfocitos T de LS de pacientes con AR pudiera mejorar tras el reposo de estos linfocitos en cultivo, los linfocitos T de LS fueron mantenidos en cultivo durante 5 días con o sin IL-2 (10 UI/mL) y luego se realizaron experimentos de proliferación similares a los descritos previamente.

Ambos grupos de células en reposo mostraron una mejoría en la respuesta proliferativa globalmente cuando se activaron a través de la molécula CD28 con activación concomitante con AcM anti-CD3 o PMA, aunque la mejoría fue significativamente mayor en el grupo precultivado con rIL-2 (figura VI.15). Sin embargo, el coestímulo a través de CD69 continuaba al menos parcialmente defectuoso, sugiriendo que la recuperación de la funcionalidad en estas dos vías de coestímulo ocurre a un ritmo diferente. Los LSP de pacientes con AR cultivados en las mismas condiciones no mostraron ningún cambio significativo en sus respuestas proliferativas (datos no mostrados).

VII. DISCUSIÓN

Existe una abundante información sobre la expresión de diversos marcadores de activación intermedios y tardíos en los linfocitos T de la AR, así como de su funcionalidad (analizada como la capacidad de inducir proliferación o la producción de anticuerpos por las células B). Sin embargo, se sabe poco acerca de los eventos más precoces de la activación T en la AR, de lo que ocurren justo antes de su entrada en ciclo celular.

La expresión de CD69 (el marcador de activación T de aparición más precoz) en un alto porcentaje, con una alta IFM y de una forma constante en los linfocitos T del LS de pacientes con AR ^(92,107), ha abierto la hipótesis de que este antígeno de activación celular pueda estar jugando un papel en la patogenia de la inflamación crónica característica de la AR. En este trabajo hemos estudiado la caracterización fenotípica de los linfocitos T CD69⁺ del LS, la regulación de su expresión y la capacidad de la molécula CD69 para inducir señales proliferativas en estos linfocitos.

1. Estudio fenotípico.

El primer grupo de experimentos fue realizado para caracterizar la población de linfocitos T presentes en el LS de pacientes con AR que expresan CD69. Como ya había sido publicado previamente ⁽⁹³⁾, hemos observado un aumento de la expresión de CD69 en las células T del LS de pacientes con AR en comparación con las células T de SP de los mismos pacientes. En muestras pareadas la expresión de CD69 fue siempre significativamente mayor en el LS que en la SP de los mismos pacientes. La alta expresión de este marcador en el microambiente sinovial implica una cierta compartimentalización del fenómeno, dado que no se habían observado previamente diferencias en cuanto a su expresión ni intensidad de fluorescencia en células T de SP entre pacientes con AR y controles sanos ⁽¹⁰⁷⁾. En nuestro trabajo, la distribución de otros marcadores de activación en

los linfocitos T del LS y SP de los pacientes con AR fue similar a la descrita en la literatura (87,91,195,196).

Se han descrito diferencias en la expresión de otros marcadores de activación en los linfocitos T de SP entre pacientes y controles (91,92). La expresión de CD69 es sin embargo similar. Esta disparidad es debida probablemente a la cinética especial de CD69. Esta molécula desaparece rápidamente de la superficie celular después de algunas horas de la activación con diferentes estímulos. Ello lleva a concluir que los linfocitos T de los pacientes con AR no están sujetos a un proceso de activación continua en SP pero sí en el LS.

La alta expresión de CD69 en linfocitos T no es una situación exclusiva de la AR. Se ha descrito una situación similar en las células T obtenidas de los órganos diana de otras enfermedades inflamatorias humanas como la esclerosis múltiple (197), la hepatitis viral crónica (198), la enfermedad de Graves (199), la sarcoidosis (200), el miocardio de los corazones transplantados (201) y en el líquido pericárdico de pacientes con derrame crónico por diversas cardiopatías (202), indicando que CD69 puede estar implicado en los mecanismos que producen inflamación crónica en diferentes patologías.

Pero no sólo se ha observado una alta expresión de CD69 en los linfocitos T en situaciones patológicas. De hecho, CD69 se expresa también en un buen número de situaciones fisiológicas que tienen como común denominador la alta exposición a Ag. Se ha descrito la expresión constitutiva de CD69 en los timocitos y en los linfocitos T de la lámina propia intestinal (203), de los pulmones de sujetos normales fumadores y no fumadores (204), en las células de Langherhans de la epidermis humana (178) y en la decidua de mujeres en los primeros meses de embarazo (205). Como se comentará más adelante, en muchas de estas situaciones patológicas y fisiológicas, los linfocitos T comparten no sólo muchas características fenotípicas con los linfocitos T del LS de los pacientes con AR, sino también funcionales.

Nosotros hemos observado que las células T CD69⁺ del LS eran predominantemente, aunque no exclusivamente, CD3⁺/CD8⁺, mientras que las células CD69⁻ mostraban un fenotipo CD3⁺/CD4⁺ en su mayoría. Este fenotipo CD69⁺/CD3⁺/CD8⁺ también predomina en el infiltrado celular de las hepatitis virales crónicas ⁽¹⁹⁸⁾ y en las biopsias de miocardio obtenidas de corazones humanos trasplantados durante el rechazo ⁽²⁰¹⁾. En ambos casos se ha propuesto que estas células CD8⁺ están jugando un papel importante en la patogenia de la enfermedad. De hecho, se ha descrito que la expresión de CD69 es necesaria para el desarrollo de ciertas funciones efectoras por las células NK ⁽²⁰⁶⁾, pero el papel que pueda jugar en las células T CD8⁺ obtenidas de pacientes con AR u otras enfermedades aún está por determinar.

También hemos observado que las células T CD69⁺ del LS eran también predominantemente CD25⁻ y HLA-DR⁺, lo que contrasta con la cinética de aparición y modulación de estos antígenos tras la activación *in vitro* de las células T normales de SP ⁽¹¹⁵⁾. Tras la activación de linfocitos T normales vía RcT/CD3, se produce la expresión y modulación secuencial y ordenada de un gran número de moléculas de superficie. En primer lugar aparecen los antígenos de activación inmediatos como CD69. A continuación, y a medida que los primeros van desapareciendo de la superficie celular, aparecen antígenos intermedios como IL-2R α (CD25) y CD71. Más tarde aparecen los antígenos de activación tardíos como HLA-DR, VLA-1 y se produce el cambio de la isoforma CD45RA a CD45RO.

La situación en LS de AR es distinta. Coexiste la expresión de CD69 y antígenos tardíos con nula o escasa expresión de antígenos de activación intermedia. Diversos estudios han confirmado que en los linfocitos T activados *in vitro* muy pocas células co-expresan CD69 con HLA-DR o VLA-1. Sin embargo, más de la mitad de los linfocitos T del LS son CD69⁺ / HLA-DR⁺ / CD25⁻, y por lo tanto parecen haberse saltado la ordenada secuencia que ha sido descrita más arriba (CD69, CD25, HLA-DR y finalmente VLA-1). De este modo, en la mayoría de las células T del líquido sinovial existen

evidencias tanto de haber sido activadas tanto muy recientemente como ya anteriormente. Se desconoce cual es la significación patogénica de este estado de activación aparentemente paradójico.

Sin embargo, es interesante hacer notar en este sentido que, como se ha mencionado, las células T presentes en órganos en los que están sometidas fisiológicamente a una alta exposición a Ag, como ocurre en la lámina propia del intestino o en los obtenidos mediante lavado broncoalveolar de sujetos normales, muestran un fenotipo (CD69⁺, CD45RO⁺, CD25⁻, CD71⁻) similar a las de las células T del LS de AR (203,204).

Se ha asumido tradicionalmente que el estado de activación de los linfocitos T del LS en la AR es debido a la activación local mediada por un Ag. Sin embargo, para que se produjera este estado de activación en el que la secuencia de aparición de antígenos de activación en la superficie no es la habitual, no todos los linfocitos pueden haber sido activados al mismo tiempo. Existen dos posibles explicaciones. En primer lugar, podrían existir diferentes subpoblaciones, cada una de las cuales expresaría diferentes antígenos de activación. Alternativamente, podrían existir otros mecanismos que regularan al alza la expresión de determinados marcadores de activación y que fueran diferentes a la activación clásica mediante Ag.

Recientemente se ha descrito un modelo de migración *in vivo* de linfocitos T en vesículas cutáneas inducidas con el derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD). Las células T obtenidas de estas vesículas expresan HLA-DR y VLA-1 ya a las 24 horas de su formación, mientras que *in vitro* los linfocitos T activados con PPD solamente expresan HLA-DR y VLA-1 una semana después de la activación, lo que sugiere que a estas vesículas migran de forma preferente células T pre-activadas (207).

Además, se ha demostrado que las células memoria (CD45RO⁺) migran de forma muy eficiente a la membrana sinovial y otros sitios de inflamación

(144,208), y que durante el proceso de migración las células T expresan CD69, y en menor medida HLA-DR (207,209,210). Ello ocurre también después de la adhesión de estas células a células endoteliales *in vitro* (207).

De este modo, el estado de activación paradójico de las células T del LS de AR no puede explicarse solamente por una o varias activaciones *in situ*, sino que también pueden existir al menos otros dos mecanismos (reclutamiento preferente de células pre-activadas y contacto con células endoteliales durante la migración) para explicarlo. Sin embargo, estos trabajos no aclaran por qué, una vez dentro del microambiente sinovial, la expresión de CD69 se mantendría más allá del contacto con las células endoteliales. Es decir, sería esperable dada la cinética de expresión de CD69 que esta molécula desapareciera de la superficie de los linfocitos T si en el LS no existieran otros estímulos que hicieran que se expresara de forma continua.

2. Regulación de la expresión de CD69.

Por ello, también hemos estudiado los mecanismos que regulan la expresión aumentada de CD69 en los linfocitos T de LS de AR. Nuestros resultados demuestran que la presencia de células no T de LS es determinante en el mantenimiento de esta expresión, como queda indicado por los experimentos en los que las células T de LS cultivadas en solitario modulaban a la baja la expresión de CD69 al contrario de lo que sucedía en aquellas cultivadas en presencia de células no T del mismo LS. Además, cuando se añadían a las 72 horas células no T de LS a un cultivo de células T en solitario se inducía una recuperación de la expresión de CD69.

El mantenimiento de CD69 depende además de interacciones directas entre ambos tipos de células ya que (a) las células no T de LS "fijadas" con paraformaldehído, que no pueden producir factores solubles (211), mantenían la expresión de CD69 de la misma forma que las células T no fijadas; (b) los sobrenadantes de cultivos de células T y no T de LS

de AR en los que se mantenía una alta expresión de CD69, fueron incapaces de mantener la expresión de CD69; y (c) tras el bloqueo de gran parte de las interacciones celulares con AcM anti-CD18, la expresión de CD69 se inhibía de forma significativa. La fracción de células no T de LS incluye células como monocitos-macrófagos, células B, células dendríticas y células de la capa bordeante sinovial ⁽²¹²⁾ que difieren en su fenotipo, capacidad para interactuar con los linfocitos T y su producción de citoquinas ^(111,157,163,213,214).

Si el mantenimiento de la expresión de CD69 en la sinovial de AR depende de la presencia de algunos de estos subtipos de células no T es algo que aún queda por investigar. Igualmente queda por establecer si son responsables de este mantenimiento de CD69 mecanismos de adhesión Ag-específicos o inespecíficos ⁽²¹⁵⁾. Existen un gran número de moléculas en la superficie de la célula T que, interaccionando con sus receptores en la CPA, pueden desencadenar señales que activen ambas células y, eventualmente, puedan dar lugar a la expresión de CD69. Por ejemplo, la expresión de diferentes moléculas de adhesión como LFA-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, VLA-4 y VLA-5 está aumentada en las células del microambiente sinovial. Y se ha demostrado que moléculas inmovilizadas de ICAM-3 sinergizan con la activación vía CD3 en la expresión de CD25 y CD69, y que el mecanismo es a través de la interacción de ICAM-3 con una integrina $\beta 2$, probablemente LFA-1, ya que los AcM anti-CD18 inhiben completamente la activación de las células T ⁽²¹⁶⁾. Además, los AcM anti- ICAM-3 son capaces de coestimular tanto linfocitos T activados como en reposo, mientras que los AcM anti-ICAM-1 sólo tienen actividad coestimuladora en los linfocitos T en reposo. También se ha demostrado que en algunas enfermedades autoinmunes en las que existe una alta expresión local de CD69 en el órgano diana, las interacciones LFA-1/ICAM-1, LFA-1/ICAM-3 y VLA-4/VCAM-1 juegan un papel determinante ⁽¹⁹⁹⁾. En nuestro sistema, el hecho de que la expresión de CD69 se modulara a la baja en los cultivos de linfocitos T y no T del LS pretratados con AcM anti-CD18 indica que las interacciones que finalmente mantienen la expresión de CD69 están relacionadas con la interacción de las

cadena $\beta 2$ de las integrinas, probablemente LFA-1, con algunos de sus ligandos.

Se desconoce qué papel puede jugar la expresión de CD69 en los linfocitos T. Sin embargo, a la luz de los últimos conocimientos sobre la *regulación fisiológica de CD69 se pueden aventurar varias hipótesis*. En primer lugar, es interesante reseñar que los linfocitos T de SP de AR expresan menos CD69 en su superficie en respuesta a AcM anti-CD3 que los linfocitos T de SP de sujetos normales ⁽¹⁰⁷⁾. Ello implica que la hiperexpresión de CD69 en LS no es una consecuencia de una tendencia intrínseca de los linfocitos T de SP a responder más vivamente a estímulos de activación. Por el contrario la respuesta defectuosa vía CD3 en SP podría deberse a una falta de acoplamiento entre el complejo R α T/CD3 y los segundos mensajeros, como también sugiere el hecho de que los linfocitos T de SP de AR respondan igual que los normales cuando son activados vía PMA que estimula directamente la PKC ⁽¹⁰⁷⁾. Resulta interesante que las células T de la lámina propia intestinal, que muestran un fenotipo similar al de las células T de LS, tienen un aumento reversible de la concentración de Ca^{2+} intracitoplásmica que impide la degradación del fosfatidilinositol-4,5-difosfato y su activación completa vía CD3 ⁽²⁰³⁾. Se puede hipotetizar que los linfocitos T CD69⁺ de LS podrían estar en una situación funcional similar y que, cuando estas células no están en contacto con las células no T en el LS o recirculan a SP, carecerían del estímulo de activación adecuado para mantener la expresión de CD69. Consecuentemente, CD69 se modularía rápidamente de la superficie aunque se mantendría temporalmente un estado de "post-activación" caracterizado por la expresión de Ag de activación tardíos ^(92,102,103) y una respuesta defectuosa vía CD3.

En este trabajo no se han estudiado directamente los mecanismos que median la inducción de CD69 en células T de LS de AR. Se ha comentado más arriba que los linfocitos T sinoviales podrían ser linfocitos previamente activados. En este sentido, se ha demostrado que las células T "memoria" (CD45RO⁺) migran de una forma preferente a los sitios de inflamación, entre

ellos a la membrana sinovial de AR (144,208) y que durante este proceso de migración se induce la expresión de CD69 en dichas células por su contacto con las células endoteliales (207,209,210). Independientemente de los mecanismos implicados en la migración y/o inducción de CD69 en células T de pacientes con AR, nuestros resultados demuestran claramente que la expresión de CD69 se mantiene en las células T de LS de AR por mecanismos de contacto directo con células no T de LS. Esto puede reflejar que dentro de la articulación estas células reciben persistentemente señales de activación (mediadas a través de moléculas de adhesión y/o mecanismos Ag específicos) que pueden tener importantes consecuencias bioquímicas y funcionales tanto para las células T como para las células no T.

Entre estas consecuencias se pueden mencionar tres específicamente: (a) el papel de CD69 en la mediación de señales de proliferación (170), (b) el papel de CD69 en el desarrollo de determinadas funciones efectoras en los linfocitos T u otras células del LS (206,217) y (c) el papel de CD69 en la inducción de citoquinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleuquina 1 beta (IL-1 β) con un papel ya demostrado en la patogenia de la AR (187,218,219). La primera de estas posibilidades será comentada más abajo. Vamos a centrarnos ahora en las otras dos.

Se ha estudiado el efecto de los AcM anti-CD69 en la inducción de actividad citolítica en diferentes tipos de células efectoras linfoides, y se ha demostrado que son capaces de desencadenar dicha actividad citolítica en células natural killer (NK) CD3⁻CD16⁺ de diferentes subtipos, clones de células NK CD3⁻CD16⁻ que no respondían a otros estímulos (incluyendo AcM anti-CD16, anti-CD2, o fitohemaglutinina) y clones de células T con R ϵ T $\gamma\delta$ de diferentes subtipos, pero no en clones de células T con R ϵ T $\alpha\beta$. Por lo tanto, parece que CD69 puede iniciar una vía de activación de diversas funciones citolíticas comunes a varios tipos de linfocitos citolíticos efectores, con la importante excepción de las células citolíticas T con R ϵ T- $\alpha\beta$, precisamente las más frecuentes dentro de los linfocitos T del LS en la AR

(206). Por lo tanto, y en lo que a los linfocitos T $\text{ReT } \alpha\beta^+/\text{CD3}^+$ respecta, parece poco probable que CD69 juegue un papel determinante en la activación de la función citolítica.

Más interés tiene el papel de CD69 en la inducción de determinadas citoquinas pro-inflamatorias. Durante los últimos años se ha demostrado que la IL-1 β y el TNF- α , que son producidos principalmente por los monocitos y macrófagos, son los principales mediadores de la inflamación y la destrucción tisular en la AR (220). El efecto sinérgico de ambos mediadores lleva a la producción de metaloproteinasas en grandes cantidades por los condrocitos, sinoviocitos y células óseas. Se ha demostrado también que el contacto directo entre los linfocitos activados y los monocitos/macrófagos es uno de los principales factores que desencadena la producción de IL-1 β y TNF- α . Esta activación está mediada por varias moléculas de superficie que se expresan en la superficie de los linfocitos activados, entre ellas CD69 (187) y CD11, y que pueden ser bloqueados mediante AcM específicos (218,219). Ello abre nuevas e importantes expectativas con implicaciones no solo patogénicas (el papel que la expresión mantenida de CD69 en los linfocitos T del LS por contacto directo con los linfocitos no T del mismo LS juega en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad) sino también de tratamiento.

3. Funcionalidad de la molécula CD69.

La activación a través de la molécula CD69 es capaz de desencadenar la proliferación de los linfocitos T normales sólo en presencia de una activación concomitante de la PKC (183). La alta expresión de CD69 podría indicar que los linfocitos T de LS de los pacientes con AR están recibiendo señales *in vivo* que podrían hacer que luego fueran capaces de responder *in vitro* al entrecruzamiento de las moléculas de CD69 en superficie con AcM. Dicho de otro modo, los linfocitos T de LS podrían haber recibido ya una de las dos señales necesarias para proliferar en este sistema (activación de la PKC) y estar primados para proliferar en respuesta a la segunda señal (los AcM anti-

CD69). Ello podría ser una vía de expansión de una determinada población en el LS. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que, a pesar de la alta expresión de CD69, los linfocitos T de LS de pacientes con AR no proliferan en presencia de AcM anti-CD69 en solitario.

Además, tras la activación con AcM anti-CD69 y PMA (un activador de la PKC), los linfocitos T del LS de pacientes con AR tuvieron una respuesta proliferativa significativamente menor que las muestras pareadas de SP de los mismos pacientes o de controles sanos. Ello demuestra que CD69 es una vía de activación defectuosa en los linfocitos T de LS de pacientes con AR.

El estado en que se encuentran estos linfocitos T del LS se asemeja a la alteración funcional observada en los linfocitos T de la lámina propia intestinal, donde existe también una alta expresión *in vivo* de CD69 pero al mismo tiempo los linfocitos tienen unas pobres respuestas proliferativas ante diferentes activadores y mitógenos ⁽²²¹⁾. Sin embargo, difiere marcadamente de los timocitos que expresan constitutivamente CD69 y no proliferan en presencia de AcM anti-CD69 solo, pero tienen una respuesta proliferativa normal si existe una activación concomitante de la PKC ⁽¹⁷⁷⁾.

Hemos observado también que los linfocitos T de LS de pacientes con AR tienen unas respuestas proliferativas anormales tras la activación a través del complejo CD3 y de la vía de coestimulación CD28, en este caso tanto en presencia de AcM anti-CD3 como de PMA. Un hecho que merece un comentario aparte es que la proliferación inducida con AcM anti-CD3 y anti-CD69 fuera siempre menor que la inducida con AcM anti-CD3 solo. Ambas vías de activación suponen un aumento de la $[Ca^{2+}]_{ic}$ y puede ocurrir que el aumento inducido por los AcM anti-CD3 sea por sí mismo suficiente, de modo que un aumento subsiguiente en la $[Ca^{2+}]_{ic}$ desencadene una señal negativa en el interior de la célula ⁽²⁰³⁾. Se ha descrito que la activación con AcM anti-CD5 tienen también un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los linfocitos T de LS de pacientes con AR ⁽²²²⁾, y esta molécula también

induce un aumento de la $[Ca^{2+}]_{ic}$.

Independientemente de esto, parece como si ningún estímulo fuera capaz de desencadenar una proliferación normal en los linfocitos T del LS de pacientes con AR. Nuestros resultados, así como los observados por otros grupos utilizando diferentes estímulos ⁽²²³⁾, implican que estas células se encuentran en un estado de anergia profunda en el cual, diferentes estímulos que son mediados a través de distintas señales transmembrana y mecanismos bioquímicos intracelulares, son igualmente ineficaces para desencadenar la proliferación celular.

Al igual que ocurre con otros receptores transmisores de señales transmembrana, la capacidad de CD69 para inducir una respuesta proliferativa, depende finalmente de la inducción de $IL-2R\alpha$ (CD25) y de la producción de IL-2 ⁽¹⁷⁰⁾. Nosotros analizamos la expresión de CD25 en los linfocitos T de pacientes con AR tras la activación con PMA y AcM anti-CD69, y nuestros resultados demuestran que estas células responden al estímulo con una expresión de CD25 más baja que las células T de SP de pacientes y controles, tanto en porcentaje como en intensidad de fluorescencia. Este resultado está en consonancia con la incapacidad de la rIL-2 exógena para revertir el defecto de proliferación en los linfocitos T del LS. Como se ha observado también con otros estímulos de activación ^(110,224,225), los linfocitos T del LS de los pacientes con AR no aumentaron su producción de IL-2, el otro evento necesario para su proliferación, en respuesta a la activación vía CD69.

Los linfocitos T del LS son fenotípicamente heterogéneos, expresan marcadores de activación tempranos y tardíos ⁽³⁾, y aproximadamente un 60% expresan CD69 ⁽¹⁰⁷⁾. Para analizar si las poblaciones de células T CD69⁺ y CD69⁻ representan dos grupos celulares funcionalmente distintos, examinamos su capacidad de proliferar en respuesta a distintos estímulos. Los linfocitos T de LS CD69⁺ y CD69⁻ fueron incapaces de proliferar tanto con

activación directa del complejo RcT-CD3 con AcM anti-CD3 como a la coestimulación vía CD69 en presencia de PMA o AcM anti-CD3. Sin embargo, la respuesta proliferativa a la activación a través de la vía de coestímulo CD28 fue significativamente mayor en los linfocitos T CD69⁻ del LS, especialmente si existía un estímulo concomitante sobre la PKC con PMA. Este resultado demuestra que las células T CD69⁻ y CD69⁺ tienen diferentes respuestas a través de vías de coestímulo alternativas. Las células T CD69⁺ tienen un marcado defecto tanto en la activación a través de CD69 como de CD28, mientras que las células T CD69⁻ muestran una respuesta parcial pero consistente a través de CD28. Dado que la expresión mantenida de CD69 es una consecuencia directa de la interacción entre las células T y no T del LS, esta interacción podría ser la responsable de la inducción y/o el mantenimiento de un estado profundo de anergia en la población celular T (226,227). Si la población de células T CD69⁺ y CD69⁻ representan dos subgrupos celulares diferentes en su sensibilidad y/o especificidad a las señales mediadas por las células no T presentes en el líquido sinovial es algo que todavía desconocemos. Sin embargo, cuando se aíslan células T de LS CD69⁻ y se les somete a diferentes estímulos in vitro (PMA o AcM anti-CD3), estas células CD69⁻ expresan CD69 en su superficie de una manera normal, sugiriendo que representan simplemente la misma población en dos situaciones funcionales distintas.

Como ha quedado demostrado, las células T del LS mantenidas en cultivo durante varios días sin la presencia de células no T del mismo LS, modulan su expresión de CD69 (107). Para avanzar en el conocimiento de la funcionalidad de los linfocitos T del LS, analizamos la respuesta proliferativa de estos linfocitos sin separar antes y después de su "reposo" en cultivo durante 5 días. Nuestros resultados indican que los linfocitos T de LS tras el reposo muestran tan solo una mejoría marginal en respuesta a la estimulación vía CD69. Sin embargo, la respuesta proliferativa a través de la molécula CD28 aumentó de forma significativa, especialmente si se añadía simultáneamente rIL-2. Se ha descrito una recuperación similar en los linfocitos T de pacientes con LES (228) y en las células T obtenidas de la

lámina propia del intestino ⁽²⁰³⁾, sugiriendo que puede haber mecanismos bioquímicos comunes en el desarrollo de anergia en los linfocitos T en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas que tienen como denominador común el hecho de que las células T reciban señales de activación de forma continua.

En conjunto, estos datos sobre la funcionalidad de los linfocitos T del LS de pacientes con AR sugieren que estas células presentan un estado de anergia profundo pero reversible, y que sus interacciones directas con las células no T del LS podrían tener importancia al menos en el mantenimiento de este deterioro funcional ⁽¹⁰⁷⁾. Una observación interesante es la respuesta diferente que se observó a través de las vías de coestímulo CD28 y CD69 en los linfocitos T CD69⁻ y en los linfocitos T tras el reposo. Las moléculas CD69 y CD28 difieren en los mecanismos intracelulares de transducción de la señal que finalmente inducen la producción de IL-2 y la expresión de IL-2R α . Mientras que CD69 actúa en concierto con la activación vía ReT/CD3, produce un aumento de la $[Ca^{2+}]_{ic}$ y es sensible a la acción de la ciclosporina A ^(229,230), el entrecruzamiento de las moléculas de CD28 produce la fosforilación de residuos de tirosina, desencadena señales tanto calcio-dependientes como calcio-independientes y es resistente a la acción de la ciclosporina A ⁽²³¹⁾. Las señales generadas a través de CD69 participan en el control de la expresión del gen de la IL-2 a nivel transcripcional (actuando probablemente a través de los factores de transcripción NFAT y AP-1) ⁽¹⁸⁹⁾, mientras que el CD28 aumenta la transcripción de IL-2 induciendo al menos otro factor de transcripción adicional específico (CD28RC) pero también estabilizando específicamente su ARNm ⁽¹³⁾.

Se podría hipotetizar que las células T del LS que expresan marcadores de activación más recientes (las células T CD69⁺) tendrían un deterioro más profundo tanto en los niveles transcripcionales como postranscripcionales comunes a las vías de activación CD69 y CD28. Por el contrario, aquellas células que son más resistentes y/o tienen una recuperación más rápida a la estimulación sostenida (las células T CD69⁻ o las células T en reposo) habrían

restaurado parcialmente una parte de los mecanismos de transmisión de la señal intracelulares, principalmente aquellos dependientes de CD28.

Pueden existir varios motivos que expliquen este estado de anergia en las células T. En primer lugar, la recepción continua de señales de activación *in vivo* dentro de la articulación puede tener importantes consecuencias bioquímicas y funcionales tanto para las células T como no T ⁽²⁰³⁾. Se ha demostrado que las células T activadas repetidamente a través del complejo R_cT/CD3 entran en un estado de anergia reversible pero de larga duración, este estado podría estar causado por la modulación de diferentes moléculas de superficie y/o la deplección de los segundos mensajeros intracelulares ⁽²³²⁾. Las interacciones entre diversas moléculas de superficie y sus ligandos, incluyendo las moléculas CD69 y CD28 ⁽²¹⁸⁾, pueden jugar un papel en la generación de señales al interior de las células que hipotéticamente pudieran inducir este estado de anergia en los linfocitos T. Verwilghen y cols. han demostrado recientemente que un 30% de los linfocitos T de la membrana sinovial de pacientes con AR expresan la molécula B7, el ligando de CD28. Además, estas células eran mucho más potentes como estimuladoras en un cultivo mixto de linfocitos alogénico primario que las células de SP, lo que indica que este B7 es funcional y que las propias células T pueden servir como CPA y de activar la vía del CD28 de forma autocrina ⁽²³³⁾. En condiciones normales, solamente las células T que son activadas repetidamente son capaces de expresar B7 ⁽²³⁴⁾, lo que de nuevo indica el alto grado de activación de estas células *in vivo*.

En segundo lugar, se ha demostrado que la exposición *in vitro* crónica al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), una citoquina pro-inflamatoria presente de forma abundante en el LS de la AR, modifica la funcionalidad de los linfocitos activados ⁽²³⁵⁾. Por el contrario, el pretratamiento durante un largo periodo *in vitro* con AcM anti-TNF neutralizante aumenta las respuestas proliferativas, aumenta la producción de linfoquinas y la producción de IL-2R α tras la activación con anti-CD3 ⁽²³⁶⁾.

Finalmente, otro factor importante en la modificación de la funcionalidad de los linfocitos T activados pueden ser varios productos de los monocitos activados como la prostaglandina E₂ (PGE₂)⁽²³⁷⁾ o los productos biológicos de la poliamina oxidasa⁽²³⁸⁾ que disminuyen la producción de IL-2. En este sentido, Flescher y cols. han demostrado que la inhibición de la producción de poliaminas aumenta la producción de IL-2 por las células mononucleares de LS de pacientes con AR⁽²³⁹⁾.

El estado funcional anormal de los linfocitos T del LS de la AR no implica que estas células sean "inocentes" en la patogenia de la AR. De hecho, estos linfocitos T de LS "anérgicos" son capaces de desarrollar importantes funciones como ayudar a las células B a diferenciar y secretar inmunoglobulinas⁽²⁴⁰⁾ e inducen la expresión de CD23 en las células B de una manera muy eficiente⁽¹⁵⁶⁾. Aunque se desconoce si CD69 tiene un contra-receptor, si es secretado al medio como ocurre con otras moléculas funcional y estructuralmente afines, así como las consecuencias funcionales

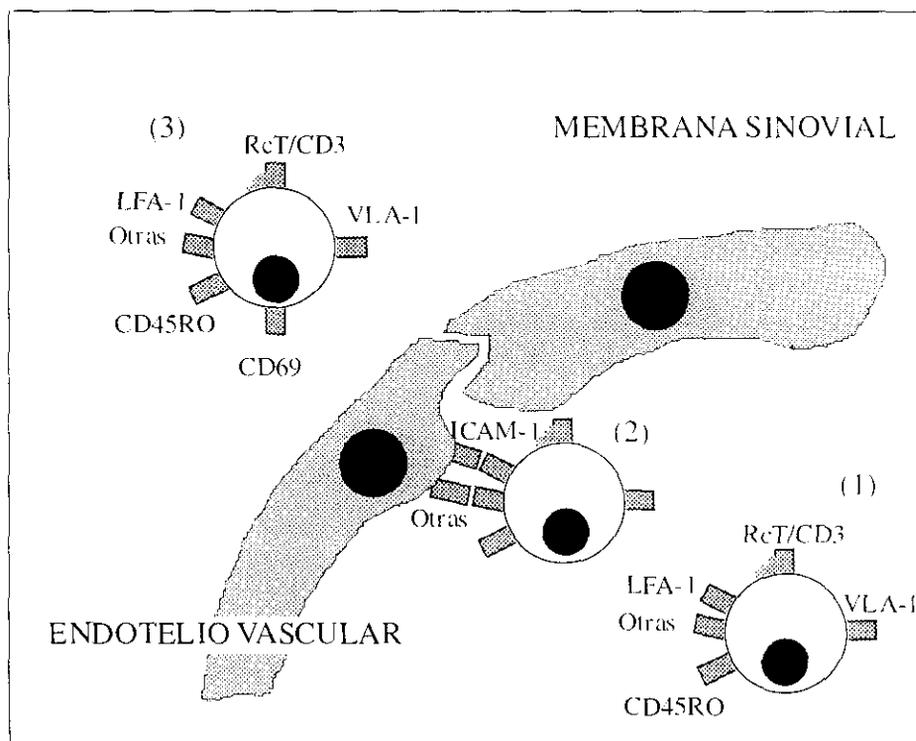


Figura VII.1. Modelo hipotético de migración y activación transendotelial de los linfocitos T en la AR.

de su expresión, a la luz de lo discutido aquí se puede avanzar un modelo hipotético de expresión, regulación y función de la molécula en la AR.

Los linfocitos T circularían en SP de los pacientes con AR en un estado de pre-activación o post-activación [figura VII.1, (1)], es decir serían células que ya han tenido un primer encuentro con un Ag hipotético y que expresarían marcadores de activación tardíos como CD45RO y VLA-1. Además, estos linfocitos T expresarían LFA-1 en su forma activada junto con otras moléculas de adhesión. Los linfocitos pre-activados migrarían de forma preferente a las articulaciones inflamadas [figura VII.1, (2)], y en el proceso de migración transendotelial y por efecto de interacciones directas entre las moléculas de adhesión de una y otra célula expresarían CD69 [figura VII.1, (3)].

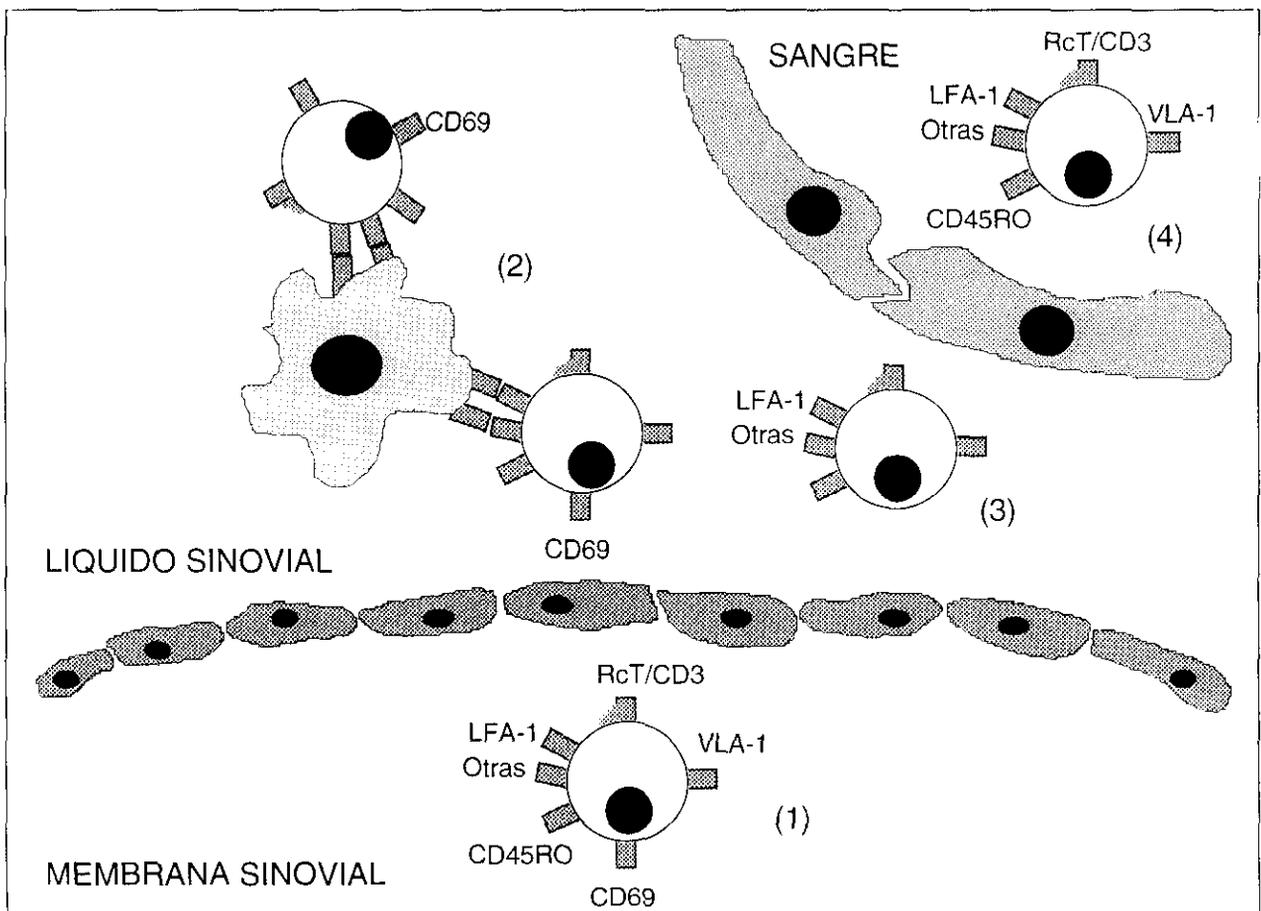


Figura VII.2. Modelo de mantenimiento de la expresión de CD69 en los linfocitos T del LS y su recirculación a sangre periférica

Nos encontraríamos entonces con unos linfocitos T en el microambiente sinovial que muestran el fenotipo característico CD3⁺/CD69⁺/CD25⁻/CD45RO⁺/HLA-DR⁺/VLA-1⁺ además del resto de moléculas de adhesión (LFA-1 activado, LFA-3, ICAM-1, VLA-4, VLA-5) [figura VII.2, (1)]. Una vez en el LS, este estado de activación se mantendría mediante el contacto directo con otras células no T presentes (monocito/macrófagos, células dendríticas, células B y/o células de la capa bordeante) [figura VII.2, (2)]. Las

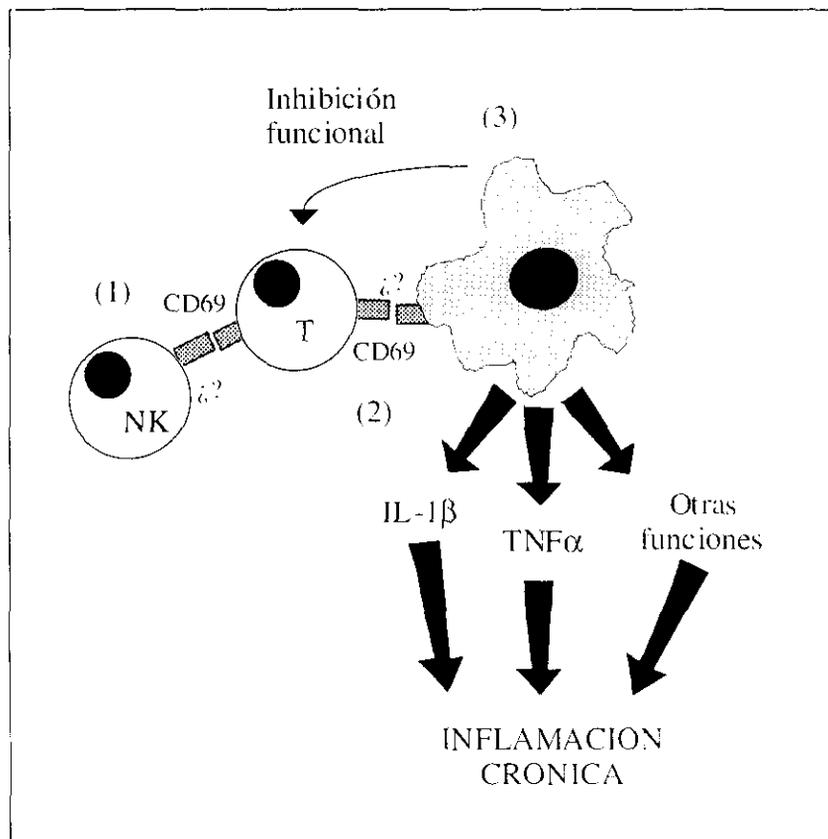


Figura VII.3. Modelo de interacción entre los linfocitos T y las células no T del LS y posibles implicaciones patológicas de CD69.

células que por algún motivo tuvieran una mayor resistencia a la activación por esta vía o no estuvieran en contacto con las células no T, modularían de la superficie el CD69 [figura VII.2, (3)]. Parte de las células del LS recircularían a SP en donde, careciendo del estímulo de las células no T del LS, no

expresan CD69 basalmente y circularían en un estado de post-activación caracterizado por una incapacidad parcial para responder a determinados estímulos [figura VII.2, (4)]. Estas mismas células pueden ser capaces de alcanzar de nuevo una articulación inflamada e iniciar el proceso.

Por último, los linfocitos T del LS con una expresión sostenida de CD69 interaccionarían con otras células en el microambiente sinovial induciendo por un lado la actividad citolítica en células NK y células T con $\text{ReT-}\gamma\delta$ [figura VII.3, (1)], y por otro la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL- 1β y TNF- α por parte de los monocitos y macrófagos [figura VII.3, (2)], las cuales, junto con otras funciones aún por determinar, contribuirían decisivamente a la inflamación crónica característica de la enfermedad. Finalmente, las CPA inhibirían funcionalmente a los linfocitos T del LS a través de la producción de TNF- α , poliaminas u otros mecanismos [figura VII.3, (3)]. De esta forma se perpetuaría este estado "raro" de activación en las células T del LS de modo que, si bien son incapaces de proliferar normalmente, sí que desarrollan otras funciones igualmente importantes.

VIII. CONCLUSIONES

1. CD69 es un marcador de activación precoz que se expresa en un alto porcentaje de los linfocitos T del LS de los pacientes con AR.

2. La alta expresión de CD69 en los linfocitos T de LS de los pacientes con AR está en consonancia con la alta expresión de HLA-DR, pero contrasta con la relativamente baja expresión de CD25, indicando que estos linfocitos muestran signos de activación tanto pasada como muy reciente

3. Los linfocitos T CD69⁺ de LS de los pacientes con AR son en su mayoría CD8⁺, CD25⁻ y HLA-DR⁺, mientras que los linfocitos T CD69⁻ son en su mayoría CD4⁺, CD25⁻ y HLA-DR⁺. La expresión de CD25 es relativamente menor en los linfocitos T CD69⁺ que en los CD69⁻.

4. La expresión de CD69 se mantiene en los linfocitos T del LS en presencia de la fracción de células no T del mismo LS.

5. El mecanismo por el que las células no T del LS mantienen la expresión de CD69 en las células T es el contacto directo célula-célula.

6. La adición de células no T a un cultivo de linfocitos T de LS es capaz de mantener la expresión de CD69 en estos linfocitos. Las células no T del LS son incapaces de inducir CD69 en los linfocitos T de SP.

7. Los linfocitos de líquido sinovial de pacientes con AR proliferan menos que los linfocitos de SP de pacientes o controles a través de la vía de coestímulo CD69 aún en presencia de activación concomitante de la PKC.

8. Esta incapacidad para proliferar a través de CD69 está en relación con

una menor expresión de CD25 y una menor producción de IL-2 cuando los linfocitos T de LS son activados con AcM anti-CD69 y PMA.

9. La menor respuesta proliferativa también a través de CD3 u otras vías de coestímulo como CD28 demuestra que los linfocitos de líquido sinovial están en un estado de anergia o hiporrespuesta frente a diferentes estímulos.

10. Los linfocitos T CD69⁺ y CD69⁻ difieren en su respuesta proliferativa a través de vías de coestímulo como CD28.

11. El estado de anergia de los linfocitos T de LS es reversible después de su cultivo en solitario durante 5 días con o sin rIL-2. La recuperación de la respuesta proliferativa es distinta a través de las vías de coestímulo CD69 y CD28: mientras después de 5 días de cultivo la recuperación de la respuesta proliferativa a través de CD28 es bastante completa, la proliferación a través de CD69 sigue siendo muy marginal.

IX. REFERENCIAS

1. Hochberg MC: Epidemiology of rheumatic disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1990; 16: 499-781
2. Fries JF: The hierarchy of outcome assesement. *J Rheumatol* 1993; 20: 546-547
3. Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH: The importance of T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 729-735
4. Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum* 1990; 33: 768-772
5. Harris ED: Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Eng J Med* 1990; 322: 1277-1289
6. Pope RM, Talal N: Autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Concepts Immunopathol* 1985; 1: 219-250
7. Schumacher HR: Synovial fluid analysis and synovial biopsy. En Kelley WN, Harris ED, Ruddy S y Sledge CB (Eds): Textbook of rheumatology. WB Saunders Company, Philadelphia 1993: 644-649
8. Ashwell JD, Klausner RD: Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 139-167
9. Parnes JR: Molecular analysis and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol* 1989; 44: 265-311
10. Mitchinson NA: Specialization, tolerance, memory, competition, latency, and strife among T cells. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 1-12
11. Geppert TD, Davis LS, Gur H, Wacholtz MC, Lipsky PE: Accessory cell signals involved in T-cell activation. *Immunol Rev* 117: 5-66, 1990

12. Johnson JG, Jenkins MK: Accessory cell-derived signals required for T cell activation. *Immunol Res* 1993; 12: 48-64
13. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB: Role of CD28 receptor in T cell activation. *Immunol Today* 1990; 11: 211-216
14. Koulova L, Clark EA, Shu G, Dupont B: The CD28 ligand B7/BB-1 provides a costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1991; 173: 759-762
15. Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM: B7, a new member of the immunoglobulin superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol* 1989; 143: 2714-2722
16. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Sugita K, Freedman AS, Morimoto C, Nadler LM: B cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete IL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6575-6579
17. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB: CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991; 147: 2461-2466
18. Azuma M, Cayabyab M, Buck D, Phillips JH, Lanier LL: CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small resting T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 175: 353-360
19. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP: CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356: 607-609
20. June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Samelson LE: Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* 1990; 144: 1591-1599

21. Rudd CE: CD4, CD8, and the TcR-CD3 complex: A novel class of protein tyrosine kinase receptor. *Immunol Today* 1990; 11: 400-406
22. Park DJ, Rho HW, Rhee SG: CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C-g1 on serine and tyrosine residues in a human T cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5453-5456
23. Crabtree GR: Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 1989; 243: 355-361
24. Smith KA: Interleukin-2: Inception, impact and implications. *Science* 1988; 240: 1169-1176
25. Taniguchi T, Minami Y: The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 1993; 73: 5-8
26. Nepom G.T. Determinants of genetic susceptibility in HLA-associated autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53: 53-62
27. Cooke TD, Scudamore RA: Studies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. I: Immunogenetic associations. *Br J Rheumatol* 1989; 28: 243-250
28. Guillemot F, Auffray Ch, Orr HT, Strominger JL: MHC antigen genes. en Hames BD y Glover DM (Eds): *Molecular immunology*. IRL press 1988: 103-114
29. Stasny P: Association of B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Eng J Med* 1978; 298: 869-871
30. Panayi GS, Wooley P, Batchelor JR: Genetic basis of rheumatoid disease: HLA antigens, disease manifestations, and toxic reactions to drugs. *Br Med J* 1978; 2: 1326-1328
31. Nakai Y, Wakisak A, Aizawa M, Iwakura K, Nakai H, Ohashi A: HLA associations with arthritis rheumatoid in Japanese. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 722-725

associations with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 1987; 7: 1-7

41. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC: A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 322: 845-50

42. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: Structure of Human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329: 506-512

43. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor R, Reinsmoen N, Bach FH: The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11: 83-88

44. Olson RR, de Magistris MT, di Tommaso A, Karr RW: Mutations in the third, but not the first or second, hypervariable region of DR(β 1*0101) eliminate DR1-restricted recognition of a pertussis toxin peptide. *J Immunol* 1992; 148: 2703-2708

45. Merryman PF, Crapper RM, Lee S, Gregersen PK, Winchester RJ: Class II major histocompatibility complex gene sequences in rheumatoid arthritis -the third diversity region of both DR-beta-1 genes in two DR1, DRw10 individuals specify the same inferred amino acid sequence as the DR-beta-1 and DR-beta-2 genes. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 251-258

46. Weyand CM, Xie C, Goronzy JJ: Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992; 89: 2033-2039

47. Weyand CM, Hicok KC, Conn D, Goronzy JJ: The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 801-806

48. Wallin J, Hillert J, Olerup O, Carlsson B, Ström H: Association of rheumatoid arthritis with a dominant DR1/Dw4/Dw14 sequence motif, but not with T cell receptor b chain gene alleles or haplotypes. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1415-1424

49. Watanabe Y, Tokunaga K, Matsuki K, Takeuchi F, Matsuta K, Maeda H, Omoto K, Juji T: Putative amino acid sequence of HLA-DRB chain contributing to rheumatoid arthritis susceptibility. *J Exp Med* 1989; 169: 2263-2268
50. Boki KA, Panayi GS, Vaughan RW, Drosos AA, Moutsopoulos HM, Lanchbury JS: HLA class II sequence polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Greeks: the HLA-DRB shared epitope hypothesis accounts for the disease in only a minority of Greek patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 749-755
51. Seglias J, Li EK, Cohen MG, Wong RWS, Potter PK, So AK: Linkage between rheumatoid arthritis susceptibility and the presence of HLA-DR4 and DRb allelic third hypervariable region sequences in southern Chinese persons. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 163-167
52. Pile KD, Tikly M, Bell JI, Wordsworth BP: HLA-DR antigens and rheumatoid arthritis in black South Africans: a ethnic group. *Tissue Antigens* 1992; 39: 138-140
53. McCusker CT, Singal DP: Molecular relationship between de class II HLA antigens and susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1988; 15: 1050-1053
54. Singal DP, Reid B, Green D, Bensen WG, D'Souza M: DNA restriction fragment polymorphism of HLA-DR2 haplotypes in normal individuals and in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 143-146
55. Greenan DM, Dyer PA: Immunogenetic of rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1988; 9: 33-34
56. Fielder AH, Ollier W, Lord DK, Burley MW, Silman A, Awad J, Festenstein H, Batchelor JR: HLA class III haplotypes in multicase rheumatoid arthritis families. *Hum Immunol* 1989; 25: 75-85
57. Sanders PA, Thomson W, Dyer PA, Greenan DM: Haplotypes bearing

- HLA-A, -B, and DR: Bf and C4 genes in rheumatoid arthritis families. *Tissue Antigens* 1989; 33: 21-29
58. Germain RH, Marguites DM: The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 403-450
59. Singal DP, Ye M, Qiu X, D'Souza M: Polymorphisms in the TAP2 gene and their association with RA. *Clin Exp Rheumatol* 1994, 12: 29-33
60. Marsal S, Hall MA, Panayi GS, Lanchbury JA: Association of TAP2 polymorphism with rheumatoid arthritis is secondary to allelic association with HLA-DRB1. *Arthritis Rheum* 1994, 37:504-513
61. Kouri T, Petersen J, Rhodes G, Aho K, Palosuo T, Heliövaara M, Isomaki H, von Essen R, Vaughan JH: Antibodies to synthetic peptides from Epstein-Barr nuclear antigen-1 in sera of patients with early rheumatoid arthritis and in preillness sera. *J Rheumatol* 1990; 17: 1442-1449
62. Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, Carson DA: Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 β -1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989. 86: 5104-5108.
63. Harris ED: Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. En Kelley WN, Harris ED, Ruddy S y Sledge CB (Eds): Textbook of rheumatology. WB Saunders Company, Philadelphia 1993: 833-873.
64. Quinn DeJoy S, Ferguson KM, Sapp TM, Zabriskie JB, Oronsky AL, Kerwas SS: Streptococcal cell wall arthritis. Passive transfer of disease with a T cell line and crossreactivity of streptococcal cell wall antigens with Mycobacterium Tuberculosis. *J Exp Med* 1989; 170: 369-382
65. van Eden W, Hogervorst EJ, Hensen EJ, van der Zee R, van Embden JD, Cohen IR: A cartilage-mimicking T-cell epitope on a 65K mycobacterial heat-shock protein: adjuvant arthritis as a model for human rheumatoid arthritis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989; 145: 27-43

66. van Eden W, Thole JER, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JD, Hensen EJ, Cohen IR: Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 1988; 331: 171-173
67. Dubois P: Heat shock proteins and immunity. *Res Immunol* 1989; 140: 653-659
68. Koga T, Wand-Württenberger A, DeBruyn J, Munk ME, Schoel B, Kaufmann SHE: T cell against a bacterial heat shock protein recognized stressed macrophages. *Science* 1989; 245: 1112-1115
69. Shoenfeld Y, Isenberg DA: Mycobacteria and autoimmunity. *Immunol Today* 1988; 9: 178-182
70. Saito H, Kranz DM, Takagazi Y, Haiday AC, Eisen HN, Tonegawa S: Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 1984; 309: 757-762
71. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman J.G, Ip S, Rosen F, Krangel MS: Identification of a putative second T cell receptor. *Nature* 1986; 322: 145-149
72. Raulet DH: Antigen for gamma delta T cells. *Nature* 1989; 339: 342-343
73. Janeway ChA, Jones B, Hayday A: Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol Today* 1988; 9: 73-75
74. Tsoulfa G, Rook GA, van Embden JD: Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 118-123
75. Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, De Bruyn J, Strober S: Isolation of CD4- CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 1989; 339: 226-229
76. Bonneville M, Ito K, Krecko EG, Itohara S, Kappes D, Ishida I.

- Kanagawa O, Janeway Ch A, Murphy DB, Tonegawa S: Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by gamma-delta T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5928-5932
77. Young RA, Elliot TJ: Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell* 1989; 59: 5-8
78. Pope RM, Pahlavani MA, LaCour E, Sambol S, Desai BV: Antigenic specificity of rheumatoid synovial fluid lymphocytes. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1371-1380
79. Stamenkovic I, Stegagno M, Wrigth KA, Krane SM, Amento AP, Colvin RB, Duquesnoy RJ, Kurnick TJ: Clonal dominance among T lymphocyte infiltrates in arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1179-1183
80. Savill CM, Delves PJ, Kioussis D, Walker P, Lydyard PM, Colaco B, Shypley M, Roitt IM: A minority of patients with rheumatoid arthritis show a dominant rearrangement of T cell receptor β chain genes in synovial lymphocytes. *Scand J Immunol* 1987; 25: 629-635
81. Londei M, Savill CM, Verhoef A, Brennan F, Leech ZA, Duance V, Maini RN, Feldmann M: Persistence of collagen type II-specific T-cell clones in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 636-640
82. Gaston JS, Life PF, Bailey LC, Bacon PA: In vitro responses to a 65-kilodalton mycobacterial protein by synovial T cells from inflammatory arthritis patients. *J Immunol* 1989; 143: 2494-2500
83. Walker C, Herzog C, Rieber P, Riethmuller G, Muller W, Pichler WJ: Anti-CD4 antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis: II. Effect of in vivo treatment on in vitro proliferative response of CD4 cells. *J Autoimmun* 1989; 2: 643-649
84. Herzog C, Walker C, Muller W, Rieber P, Reiter C, Riethmuller G, Wassmer P, Stockinger H, Madic O, Pichler WJ: Anti-CD4 antibody treatment

of patients with rheumatoid arthritis: I. Effect on clinical course and circulating T cells. *J Autoimmun* 1989; 2: 627-642

85. Duby AD, Sinclair AK, Osborne-Lawrence SL, Zeldes W, Kan L, Fox DA: Clonal heterogeneity of synovial fluid T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6206-6210

86. Brennan FM, Allard S, Londei M, Savill C, Boylston A, Carrel S, Maini RN, Feldmann M: Heterogeneity of T cell receptor idiotypes in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 1988; 73: 417-423

87. Cush JJ, Lipsky PE: Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1230-1238

88. Pitzalis C, Kingsley GH, Murphy J, Panayi GS: Abnormal distribution of the helper-inducer and suppressor-inducer T lymphocyte subsets in rheumatoid joints. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 45: 252-258

89. Takahashi H, Söderström K, Nilsson E, Kiessling R, Patarroyo M: Integrins and other adhesion molecules on lymphocytes from synovial fluid and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2879-2885

90. Potocnik AJ, Kinne R, Menninger H, Zacher J, Emmrich F, Kroczeck RA: Expression of activation antigens on T cells in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Immunol* 1990; 31: 213-224

91. Fox RI, Fong S, Sabharwal N, Carstens SA, Kung PC, Vaughan JH: Synovial fluid lymphocytes differ from peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1982; 128: 351-354

92. Laffón A, García-Vicuña R, Humbría A, Postigo AA, Corbí AL, O. de Landazuri M, Sánchez-Madrid F: Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1991; 88: 456-552

93. Afeltra A, Galeazzi M, Ferri GM, Amoroso A, De Pita' O, Porzio F, Bonomo L: Expression of CD69 antigen on synovial fluid T cells in patients with rheumatoid arthritis and other chronic synovitis. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 457-460
94. Zvaifler NJ: Fractionated total lymphoid irradiation: a promising new treatment for rheumatoid arthritis? Yes, no, maybe. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 109-114
95. Winchester RJ, Gregersen PK: The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis: the conformational equivalence hypothesis. *Springer Semin Immunopathol* 1988; 10: 119-139
96. Espinoza LR, Aguilar JL, Berman A, Gutierrez F, Vasey FB, Germain BF: Rheumatic manifestations associated with human immunodeficiency virus infection. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1615-1622
97. Klareskog L, Forsum U, Tjernlund UM, Kabelitz D, Wigren A: Appearance of anti-HLA-DR-reactive cells in normal and rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* 1981; 14: 183-192
98. Burmester GR, Jahn B, Rohwer P, Zacher J, Winchester RJ, Kalden JR: Differential expression of Ia antigens by rheumatoid synovial lining cells. *J Clin Invest* 1987; 80: 595-604
99. Forre O, Dobloug JH, Natvig JB: Augmented number of HLA-DR-positive T lymphocytes in the synovial fluid and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 1982; 15: 227-231
100. Forre O, Thoen J, Lea T, Dobloug JH, Mellbye OJ, Natvig JB, Pahle J, Solheim BG: In situ characterization of mononuclear cells in rheumatoid tissues, using monoclonal antibodies. No reduction of T8-positive cells or augmentation in T4-positive cells. *Scand J Immunol* 1982; 16: 315-319
101. Goto M, Miyamoto T, Nishioka K, Uchida S: T cytotoxic and helper

cells are markedly increased and T suppressor and inducer cells are markedly decreased in rheumatoid synovial fluids. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 737-743

102. Hemler ME, Glass D, Colbyn JS: Very late activation antigens in rheumatoid synovial fluid T lymphocytes. Association with stages of T cell activation. *J Clin Invest* 1986; 78: 696-702

103. Laffón A, Sánchez-Madrid F, O. de Landazuri M, Jimenez Cuesta A, Ariza A, Ossorio C, Sabando P. Very late activation antigen on synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 386-392

104. Nakao H, Eguchi K, Kawakami A, Migita K, Otsubo T, Ueki Y, Shimomura C, Tezuka H, Mastsunaga M, Maeda K, Nagataki S: Increment of Tal positive cells in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989; 16: 904-910

105. Yu DTY, Winchester RJ, Fu SM, Gibofsky A, Ko HS, Kunkel HG: Peripheral blood Ia-positive T cells. *J Exp Med* 1980; 151: 91-100

106. Emery P, Wood N, Gentry K, Stockman A, Mackay IR, Bernard O: High-affinity interleukin-2 receptors on blood lymphocytes are decreased during active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1176-1181

107. Fernández-Gutiérrez B, Hernández-García C, Bañares AA, Jover JA: Characterization and regulation of CD69 expression on rheumatoid arthritis synovial fluid T cells. *J Rheumatol* 1995; 22: 413-420

108. Maurer D, Felzmann T, Holter W, Petera P, Smolen J, Knapp W: Evidence for the presence of activated CD4 T cells with naive phenotype in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med* 1992; 87: 429-434

109. Lotz M, Tsoukas CD, Robinson CA, Dinarello CA, Carson DA, Vaughan JH: Basis for defective responses of rheumatoid arthritis synovial fluid lymphocytes to anti-CD3 (T3) antibody. *J Clin Invest* 1986; 78: 713-721

110. Talal N, Tovar Z, Dauphinee MJ, Flescher E, Dang H, Galarza D: Abnormalities of T cell activation in the rheumatoid synovium detected with monoclonal antibodies to CD3. *Scand J Rheumatol* 1988; 76 (suppl): 175-182
111. Firestein GS, Xu WD, Townsend K, Broide D, Alvaro-Gracia J, Glasebrook A, Zvaifler NJ: Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I. Failure to detect T cell lymphokines (IL-2 and IL-3) and presence of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 1988; 168: 1573-1586
112. Qu Z, Hernández-García C, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT: Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 212-220
113. Konttinen YT, Nykanen P, Nordstrom D, Saari H, Sandelin J, Santavirta S, Kouri T: DNA synthesis in prolyl 4-hydroxylase positive fibroblast in situ in synovial tissue: an autoradiography-immunoperoxidase double labeling study. *J Rheumatol* 1989; 16: 339-345
114. Nykanen P, Bergroth V, Raunio P, Nordstrom D, Konttinen YT: Phenotypic characterization of 3H-thymidine incorporating cells in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Rheumatol Int* 1986; 6: 269-271
115. Biselli R, Matricardi PM, D'Amelio R, Fattorossi A: Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes. *Scand J Immunol* 1992; 35: 439-447
116. Pitzalis C, Kingsley GH, Lanchbury JSS, Murphy J, Panayi GS: Expression of HLA DR, DQ and DP antigens and IL-2 receptor of synovial fluid T lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis: evidence for a "frustrated" activation. *J Rheumatol* 1987; 14: 662-666
117. Miossec P, Naviliat M., Dupuy D'Angeac A., Sany J., Banchereau J., Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor β in

rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1180-1187

118. Firestein GS, Zvaifler NJ: Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid interferon suggest that γ -interferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 864-871

119. Miossec P: Cytokine abnormalities in inflammatory arthritis. *Baillière's Clin Rheumatol* 1992; 6: 373-391

120. Pallard X, West SG, Lafferty JA, Clemens JR, Kappler JW, Marrack P, Kotzin BL: Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 1991; 253: 325-329

121. Howell MD, Diveley JP, Lundeen KA, Esty A, Winters ST, Carlo DJ, Brostoff SW: Limited T-cell receptor β -chain heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10921-10925

122. Friedman SM, Crow MK, Tumang JR, Tumang M, Xu Y, Hodtsev AS, Cole BC, Posnett DN: Characterization of human T cells reactive with the *Mycoplasma Arthritis* -derived superantigen (MAM): generation of a monoclonal antibody against V β 17, the T cells receptor gene product expressed by a large fraction of MAM-reactive human T cells. *J Exp Med* 1991; 174: 891-900

123. Williams WV, Fang Q, Demarco D, von Feldt J, Zurier RB, Weiner DB: Restricted heterogeneity of T cells receptor transcript in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992; 90: 326-333

124. Sottini A, Imberti L, Gorla R, Cattaneo R, Primi D: Restricted expression of T cells receptor V β but not V α genes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1991; 21: 461-466

125. Bucht A, Oksenberg JR, Lindblad S, Grönberg A, Steinman L, Klareskog L: Characterization of T-cell receptor ab repertoire in synovial tissue from

different temporal phases of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 1992; 35: 159-165

126. Gudmundsson S, Rönnelid J, Karlsson-Parra A, Lysholm J, Gubdjörnsson B, Widenfalk B, Janson CH, Klareskog L: T-cell receptor V-gene usage in synovial fluid and synovial tissue from RA patients. *Scand J Immunol* 1992; 36: 681-688

127. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE: Spreading of T cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992; 358: 155-157

128. Oppenheimer-Marks N, Ziff M: Binding of normal human mononuclear cells to blood vessels in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 789-792

129. Iguchi T, Ziff M: Electron microscopic study of rheumatoid synovial vasculature. *J Clin Invest* 1986; 77: 355-361

130. Yanni G, Whelan A, Feighery C, Fitzgerald O, Bresnihan B: Morphometric analysis of synovial membrane blood vessels in rheumatoid arthritis: associations with immunohistologic features, synovial fluid cytokine levels and the clinical course. *J Rheumatol* 1993; 20: 634-638

131. Munro JM, Pober JS, Cotran RS: Tumor necrosis factor and interferon- γ induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of Papio Anubis. *Am J Pathol* 1989; 135: 121-133

132. Damle NK, Aruffo A: Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6403-6407

133. van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S: The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 1990; 144: 4579-4586

134. Springer TA: Adhesion receptor of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-434
135. Tanaka Y, Albelda SM, Horgan KJ, van Seventer GA, Shimizu Y, Newman W, Hallam J, Newman PJ, Buck CA, Shaw S: CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferred amplifier of β 1 integrin-mediated adhesion. *J Exp Med* 1992; 176: 245-253
136. Butcher EC: Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps for specificity and diversity. *Cell* 1991; 67: 1033-1036
137. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Lipsky PE: Human T lymphocyte adhesion to endothelial cells and transendothelial migration. Alteration of receptor use relates to the activation status of both the T cell and the endothelial cell. *J Immunol* 1990; 145: 140-148
138. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT, Ramberg J, Lipsky PE: Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 1991; 147: 2913-2921
139. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ: Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 α and MIP-1 β . *Science* 1993; 260: 355-358
140. Grober JS, Bowen BL, Ebling H, Athey B, Thompson B, Fox DA, Stoolman LM: Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis. In situ detection of selectin and integrin dependent interactions. *J Clin Invest* 1993; 91: 2609-2619
141. Postigo AA, García-Vicuña R, Díaz-González F, Arroyo AG, de Landazuri MO, Chi-Rosso G, Lobb RR, Laffon A, Sánchez-Madrid F: Increased binding of synovial T lymphocytes from rheumatoid arthritis to endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Clin Invest* 1992; 89: 1445-1452.

142. Kavanaugh AF, Nichols L, Lipsky PE: Treatment of refractory rheumatoid arthritis with an anti-CD54 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) monoclonal antibody. *Arthritis Rheum* 1992; 35: s43
143. Damle NK, Doyle LV: Ability of human T lymphocytes to adhere to vascular endothelial cells and to augment endothelial permeability to macromolecules is linked to their state of post-thymic maturation. *J Immunol* 1990; 144: 1233-1240
144. Cush JJ, Pietschmann P, Oppenheimer-Marks N, Lipsky PE: The intrinsic migratory capacity of memory T cells contributes to their accumulation in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 1434-1444
145. Pietschmann P, Cush JJ, Lipsky PE, Oppenheimer-Marks N: Identification of subsets of human T cells capable of enhanced transendothelial migration. *J Immunol* 1992; 149: 1170-1178
146. Jasin HE, Lightfoot E, Davis LS, Rothlein R, Faanes RB, Lipsky PE: Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbits treated with monoclonal antibodies to leukocyte adhesion molecules. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 541-549
147. Iiogo Y, Takashi T, Tamatani T, Miyasaka M, Higashida T, Yagita H, Okumura K, Tsukada W: ICAM-1 dependent pathway is critically involved in the pathogenesis of adjuvant arthritis in rats. *J Immunol* 1991; 147: 4167-4171
148. Eliaou JF, Andary M., Favier F., Carayon P., Poncelet P., Sany J., Brochier J., Clot J. Increase of class II HLA molecules on the membrane of B lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 1988; 1: 217-222
149. Wernick RM., Lipsky PE., Marban-Arcos E., Maliakkal JJ., Edelbaum D., Ziff M. IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 742-752
150. Al-Balaghi S., Ström H., Möller E. B cell differentiation factor in

synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 1984; 78: 7-23

151. Olsen NJ., Jasin HE. Synthesis of rheumatoid factor in vitro: Implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1985; 15: 146-156

152. Kumagai S; Ishida H; Iwai K; Tsubata T; Umehara H; Ozaki S; Suginoshita T; Araya S; Imura H. Possible different mechanisms of B cell activation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: opposite expression of low-affinity receptors for IgE (CD23) on their peripheral B cells. *Clin-Exp-Immunol* 1989; 78: 348-353

153. Hellen EA; Rowlands DC; Hansel TT; Kitas GD; Crocker J Immunohistochemical demonstration of CD23 expression on lymphocytes in rheumatoid synovitis. *J-Clin-Pathol* 1991; 44: 293-296

154. Chomarat P., Briolay J., Banchereau J., Miossec P. Increased production of soluble CD23 in rheumatoid arthritis, and its regulation by interleukin-4. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 234-242

155. Delespesse G., Sarfati M., Wu Y., Fournier S., Letellier M., The low-affinity receptor for IgE. *Immunol Rev* 1992; 125: 77-97

156. Fernández-Gutiérrez B, Hernández-García C, Bañares AA, Jover JA: CD23 hyperexpression in rheumatoid arthritis: evidence for a B cell hyperresponsiveness to cognate and non-cognate T-cell signals. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 72: 321-327

157. Steinman RM: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-296

158. Van Voorhis WC, Valinsky J, Hoffman E, Steinman RM: The relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med* 1983; 158: 174-191

159. Harding B, Knight S: The distribution of dendritic cells in the synovial fluids of patients with arthritis. *Clin Exp Immunol* 1986; 63: 594-600
160. Poulter LW: The involvement of dendritic cells in chronic inflammatory disease. *Scand J Immunol* 1985; 121: 401-407
161. Poulter LW, Duke O, Hobbs S, Janossy G, Panayi GS: Histochemical discrimination of HLA-DR positive cell populations in the normal and arthritic synovial lining. *Clin Exp Immunol* 1982; 48: 381-388
162. Anna CHM, Dinther-Janssen V, Pals ST, Scheper R, Breedveld F, Meijer CJLM: Dendritic cells and high endothelial venules in the rheumatoid synovial membrane. *J Rheumatol* 1990; 17: 11-17
163. Tsai V, Zvaifler NJ: Dendritic cell-lymphocyte clusters that form spontaneously in rheumatoid arthritis synovial effusions differ from clusters formed in human mixed leukocyte reactions. *J Clin Invest* 1988; 82: 1731-1745
164. Case JP, Lafyatis R, Remmers EF, Kumkumian GK, Wilder RL: Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium. *Am J Pathol* 1989; 135: 1055-1064
165. Okada Y, Gonoji Y, Nakanishi I, Nagase H, Hayakawa T: Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. *Virchows Arch* 1990; 59: 305-312
166. Firestein GS, Paine MM, Littman BH: Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase, complement and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1094-1105
167. Lotz M, Guerne PA: Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem* 1991; 266: 2017-2020

168. Hara T, Jung LKL, Bjorndahl JM, Fu SM: Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens and antigens. *J Exp Med* 1986; 164: 1988-2005
169. Cosulich E, Rubartelli A, Risso A, Cozzolino F, Bargellesi A: Functional characterization of an antigen involved in an early step of T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4205-4209
170. Cebrián M, Yagüe E, Rincón M, López-Botet M, Ortiz de Landázuri M, Sanchez-Madrid F: Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 168: 1621-1637
171. Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C, Phillips JH: Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu 23 activation antigen. *J Exp Med* 1988; 167: 1572-1585
172. Schwarting R, Niedobitek G, Stein H: Cluster report. En: Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Knapp W, Doerken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, Von der Borne A, eds. Oxford University Press, Oxford, UK: 432
173. Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F: Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2317-2325
174. López-Cabrera M, Santís AG, Fernández-Ruíz E, Blacher R, Esch F, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Madrid F: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal transmitting receptors. *J Exp Med* 1993; 178: 537-547

175. Hamann J, Fiebig H, Strauss M: Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J Immunol* 1993; 150: 4920-4927
176. Ziegler SF, Ramsdell F, Hjerrild KA, Armitage RJ, Grabstein KH, Hennen KB, Farrah T, Fanslow WC, Shevach EM, Alderson MR: Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to the family of natural killer cell activation antigens. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1643-1648
177. Sanchez-Mateos P, Cebrián M, Acevedo A, López-Botet M, Ortiz de Landázuri M, Sanchez-Madrid F: Expression of a gp 33/27.000 MW activation inducer molecule (AIM) on human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies. *Immunology* 1989; 68: 72-79
178. Bieber T, Rieger A, Stingl G, Sander E, Wanek P, Strobel I: CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 771-776
179. Testi R, Pulcinelli F, Frati L, Gazzaniga PP, Santoni A: CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J Exp Med* 1990; 172: 701-706
180. Risso A, Smilovich D, Capra MC, Baldissarro I, Yan G, Bargelessi A, Cosulich ME: CD69 in resting and activated T lymphocytes. *J Immunol* 1991; 146: 4105-4114
181. Testi R, Phillips JH, Lanier LL: Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol* 1989; 142: 1854-1860
182. Verwilghen J, Vandenberghe P, Wallays G, de Boer M, Anthony N, Panayi GS, Ceuppens JL: Simultaneous ligation of CD5 and CD28 on resting

T lymphocytes induces T cell activation in the absence of T cell receptor/CD3 occupancy. *J Immunol* 1993; 150: 835-846

183. Cebrian M, Redondo JM, Lopez-Rivas A, Rodriguez G, O de Landázury M, Sánchez-Madrid F: Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur J Immunol* 1989; 19: 809-815

184. Borrego F, Peña J, Solana R: Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1039-1043

185. Testi R, Phillips JH, Lanier LL: T cell activation via Leu 23 (CD69). *J Immunol* 1989; 143: 1123-1128

186. Rincón M, Cebrián M, Sánchez-Madrid F, López-Botet M: Induction of T cell function via the gp33/27 activation inducer molecule (AIM) requires co-expression of the CD3/TcR complex. *Eur J Immunol* 1989; 19: 959-962

187. Santis AG; Campanero MR; Alonso JL; Tugores A; Alonso MA; Yague E; Pivel JP; Sanchez-Madrid F: Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1253-1259

188. Tugores A, Alonso MA, Sanchez-Madrid F, de Landazuri MO: Human T cell activation through the activation-inducer molecule/CD69 enhances the activity of transcription factor AP-1. *J Immunol* 1992; 148: 2300-2306

189. D'Ambrosio D, Trotta R, Vacca A, Frati L, Santoni A, Gulino A, Testi R: Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression by CD69-generated signals. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2993-2997

190. Arnet FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Lealey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Jr., Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the

classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-324

191. Gottlieb AB, Fu SM, Yu DTY, Wang CY, Halper JP, Kunkel HG: The nature of the stimulatory cell in human allogeneic and autologous MLC reactions; role of isolated IgM-bearing B cells. *J Immunol* 1979; 123: 1497-1502

192. Lewis DE, Rickman WJ: Methodology and quality control for flow cytometry. En Rose NR y cols. (Eds): *Manual of clinical laboratory immunology* 4ª Edición. American Society for Microbiology, Washington 1992: 164-173

193. Crow MK, Jover JA, Friedman S: Direct T helper-B cell interactions induce an early B cell activation antigen. *J Exp Med* 1986; 164: 1760-1772

194. Crow MK, Kushner B, Jover JA, Friedman S, Mechanic SE, Stohl W. Human peripheral blood T helper cell-induced B cell activation results in B cell surface expression of the CD23 (BLAST-2) antigen. *Cell Immunol* 1989; 121: 99-112

195. Russell AS: Activated lymphocytes in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1990; 17: 589-596

196. Smith MD, Roberts-Thomson PJ: Lymphocyte surface marker expression in rheumatic diseases: evidence for prior activation of lymphocytes in vivo. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 81-87

197. Perrella O, Carrieri PB, De Mercato R, Buscaino GA: Markers of activated T lymphocytes on T cells receptor gamma/delta+ in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 1993; 33: 152-155

198. García Monzón C, Moreno-Otero R, Pajares JM, et al: Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1990; 98: 1029-1035

199. Marazuela M, Postigo AA, Acevedo A, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-

Madrid F, de Landazuri MO: Adhesion molecules from the LFA-1/ICAM-1.3 and VLA-4/VCAM-1 pathways on T lymphocytes and vascular endothelium in Graves' and Hashimoto's thyroid glands. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2483-2490

200. Hol BE, Hintzen RQ, Van Lier RA, Alberts C, Out TA, Jansen HM: Soluble and cellular markers of T cell activation in patients with pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 643-649

201. Santamaria M, Marubayashi M, Arizon JM, Montero A, Concha M, Valles F, Lopez A, Lopez F, Peña J: The activation antigen CD69 is selectively expressed on CD8+ endomyocardium infiltrating T lymphocytes in human rejecting heart allografts. *Hum Immunol* 1992; 33: 1-4

202. Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S, Langner J: Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 104: 48-56

203. De Maria R, Fais S, Silvestri M, Frati L, Pallone F, Santoni A, Testi R: Continuous in vivo activation and transient hyporesponsiveness to TcR/CD3 triggering of human gut lamina propria lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993; 23: 3104-3108

204. Ancochea J, Gonzalez A, Sánchez MJ, Aspa J, López-Botet: Expression of lymphocyte activation surface antigens in brochoalveolar lavage and peripheral blood cells from young healthy subjects. *Chest* 1993; 104: 32-37

205. Saito S, Nishikawa K, Morii T, Narita N, Enomoto M, Ichijo M: Expression of activation antigens CD69, HLA-DR, interleukin-2 receptor-alpha (IL-2R alpha) and IL-2R beta on T cells of human decidua at an early stage of pregnancy. *Immunology* 1992; 75: 710-712.

206. Moretta A, Poggi A, Pende D, Tripodi G, Orengo AM, Pella N, Augugliaro R, Bottino C, Ciccone E, Moretta L: CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic

activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* 1991; 174: 1393-1398

207. Iannone F; Corrigan VM; Kingsley GH; Panayi GS: Evidence for the continuous recruitment and activation of T cells into the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2706-2713.

208. Pitzalis C, Kingsley GH, Covelli M, Meliconi R, Markey A, Panayi GS: Selective migration of the human-helper-inducer memory T cell subset: confirmation by in vivo cellular kinetic studies. *Eur J Immunol* 1991; 21: 369-376

209. Galea P, Brezinschek R, Lipsky PE, Oppenheimer-Marks N, Harold C: Phenotypic characterization of CD4⁻ αβ TCR⁺ and γδ TCR⁺ T cells with a transendothelial migratory capacity. *J Immunol* 1994; 153: 529-542

210. Brezinschek R, Vita R, Galea P, Oppenheimer-Marks N, Lipsky PE: Phenotypic characterization of CD4⁺ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J Immunol* 1995; 159: 3062-3077

211. Moreno J, Lipsky PE: Differential ability of fixed antigen-presenting cells to stimulate nominal antigen-reactive and alloreactive T4 lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 3579-3585

212. Firestein GS, Tsai V, Zvaifler N: Cellular immunity in the joints of patients with rheumatoid arthritis and other forms of chronic synovitis. *Rheum Dis Clin North Am* 1987; 13: 191-213

213. Hogg N, Palmer DG, Revell PA: Mononuclear phagocytes of normal and rheumatoid synovial membrane identified by monoclonal antibodies. *Immunology* 1985; 56: 673-681

214. Burns CM, Tsai V, Zvaifler NJ: High percentage of CD8⁺, Leu-7⁺ cells in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 865-873

215. Wacholtz MC, Patel SS, Lipsky PE. Leukocyte function-associated antigen 1 is an activation molecule for human T cells. *J Exp Med* 1989; 170: 431-448
216. Hernandez-Caselles T, Rubio G, Campanero MR, del Pozo MA, Muro M, Sanchez-Madrid F, Aparicio P: ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2799-2806
217. Hommel-Berrey GA, Shenoy AM, Brahmi Z: Receptor modulation and early signal transduction events in cytotoxic T lymphocytes inactivated by sensitive target cells. *J Immunol* 1991; 147: 3237-3243
218. Manie S, Kubar J, Limouse M, Ferrua B, Ticchioni M, Breittmayer JP, Peyron JF, Schaffar L, Rossi B: CD3-stimulated Jurkat T cells mediate IL-1 beta production in monocytic THP-1 cells. Role of LFA-1 molecule and participation of CD69 T cell antigen. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4: 7-13
219. Isler P, Vey E, Zhang JH, Dayer JM: Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of IL-1b by monocytic cells: a possible role of CD69. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4: 15-23
220. Dayer JM: Cytokines and anti-cytokines in inflammatory rheumatism. *Rev Rhum* 1994; 61: 173-180
221. Sydora BC, Mixter PF, Holcombe H, Eghtesady P, Williams K, Amaral MC, Nel A, Kronenberg M: Intestinal intraepithelial lymphocytes are activated and cytolytic but do not proliferate as well as other T cells in response to mitogenic signals. *J Immunol* 1993; 150: 2179-2191
222. Verwilghen J, Kingsley GH, Ceuppens JL, Panayi GS: Inhibition of synovial fluid T cell proliferation by anti-CD5 monoclonal antibodies. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 1445-1451
223. Verwilghen J, Corrigan V, Pope RM, Rodrigues R, Panayi GS: Expression and function of CD5 and CD28 in patients with rheumatoid

arthritis. *Immunology* 1993; 80: 96-102

224. Kitas GD, Salmon M, Farr M, Gaston JS, Bacon PA: Deficient interleukin 2 production in rheumatoid arthritis: association with active disease and systemic complications. *Clin Exp Immunol* 1988; 73: 242-249

225. Hovdenes J, Gaudernack G, Kvien TK, Egeland T, Mellbye OJ: A functional study of purified CD4+ and CD8+ cells isolated from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Scand J Immunol* 1989; 29: 641-649

226. Klareskog L, Forsum U, Scheynius A, Kabelitz D, Wigzell H: Evidence in support of a self-perpetuating HLA-DR dependent delayed type cell interaction in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 3632-3636

227. Janossy G, Duke O, Poulter LW, Panayi GS, Bofill M, Goldstein G: Rheumatoid arthritis: a disease of T lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 1981; 2: 839-842

228. Huang YP, Miescher PA, Zubler RH: The interleukin 2 secretion defect in vitro in systemic lupus erithematosus is reversible in rested cultured T cells. *J Immunol* 1986; 137: 3515-3520.

229. Testi R, Pulcinelli F, Cifone MG, Botti D, Del Grosso E, Riordino S, Frati L, Gazzaniga PP, Santoni A: Preferential involvement of a phospholipase A2-dependent pathway in CD69-mediated platelet activation. *J Immunol* 1992; 148: 2867-2871.

230. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A: The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15: 479-483

231. Linsley PS, Ledbetter JA: The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 191-211

232. Jenkins MK, Miller RA: Memory and anergy: challenges to traditional models of T lymphocyte differentiation. *FASEB J* 1992; 6: 2428-2433
233. Verwilghen J, Lovis R, De Boer M, Linsley PS, Haines GK, Koch AE, Pope RM: Expression of functional B7 and CTLA4 on rheumatoid synovial T cells. *J Immunol* 1994; 153: 1378-1385
234. Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL: Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 177: 845-848
235. Beutler B, Cerami A: The biology of cachectin/TNF -a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 625-655
236. Cope AP, Londei M, Randall Chu N, Cohen SBA, Elliott MJ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M: Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; Reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994; 94: 749-760
237. Rappaport RS, Dodge GR: Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin-2. *J Exp Med* 1982; 155: 943-948
238. Flescher E, Bowlin TL, Talal N: Polyamine oxidation down-regulates IL-2 production by human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1989; 142: 907-912
239. Flescher E, Bowlin TL, Ballester A, Houk R, Talal N: Increased polyamines may downregulate interleukin 2 production in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1989; 83: 1356-1362
240. Thomas R, McIlraith M, Davis LS, Lipsky PE: Rheumatoid synovium is enriched in CD45RBdim mature memory T cells that are potent helpers for B cell differentiation. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 1455-1465

Madrid, 1996