

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN ANORMAL DE LOS  
LINFOCITOS T Y B DE PACIENTES CON ARTRITIS  
REUMATOIDE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Sonia de Miguel Olalla**

Bajo la dirección de los doctores:  
Benjamín Fernández Gutiérrez y Juan Ángel Jover Jover

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-1706-3**

T 25047

# TESIS DOCTORAL

## ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN ANORMAL DE LOS LINFOCITOS T Y B DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314019196

AUTOR: SONIA DE MIGUEL OLALLA

DIRECTOR: BENJAMÍN FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ  
JUAN ANGEL JOVER JOVER

LUGAR DE REALIZACIÓN: SERVICIO DE REUMATOLOGIA  
HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS  
MADRID

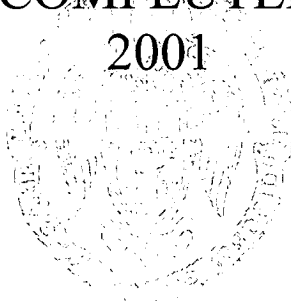
Firma del interesado

VºBº Director de la tesis

VºBº del Tutor

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

2001



BIBLIOTECA

MUCHAS GRACIAS

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
---------------------------	---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
---------------------------	---

1. Artritis reumatoide .....	4
1.1. Características generales .....	4
1.2. Etiología .....	4
1.2.1. Factores genéticos .....	4
1.2.1.1. Estudios familiares .....	4
1.2.1.2. Marcadores genéticos .....	5
1.2.1.3. Influencia de los factores genéticos .....	5
1.2.2. Factores del huésped .....	5
1.2.2.1. Factores endocrinológicos .....	5
1.2.2.2. Sistema inmune del huésped .....	5
1.2.3. Factores externos .....	6
1.2.3.1. Agentes infecciosos .....	6
1.2.3.2. Situación socioeconómica .....	6
1.3. Anatomía patológica .....	7
1.3.1. Sinovitis reumatoide .....	7
1.3.2. Nódulo reumatoide .....	7
1.3.3. Vasculitis reumatoide .....	8
1.4. Características clínicas .....	8
1.4.1. Síntomas y signos .....	8
1.4.1.1. Manifestaciones articulares .....	8
1.4.1.2. Manifestaciones extraarticulares .....	9
1.4.2. Datos de laboratorio .....	10
1.4.2.1. Factor reumatoide .....	10
1.4.2.2. Hemograma .....	10
1.4.2.3. Reactantes de fase aguda .....	10
1.4.2.4. Análisis de líquido sinovial .....	10
1.4.3. Datos radiológicos .....	11
1.5. Características inmunológicas .....	11
1.6. Datos del laboratorio de Inmunología .....	15
1.7. Tratamiento .....	16
1.7.1. Fisioterapia .....	16
1.7.2. Tratamiento con fármacos .....	16
1.7.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos .....	16
1.7.2.2. Fármacos modificadores del curso de la enfermedad .....	16
1.7.2.3. Corticosteroides .....	17
1.7.3. Nuevos enfoques terapéuticos .....	17
1.7.3.1. Anticuerpos monoclonales .....	18
1.7.3.2. Citocinas y anti-citocinas .....	19

2. Activación fisiológica del linfocito T .....	21
3. Familia del factor de necrosis tumoral (TNF) .....	25
3.1. Estructura genómica .....	27
3.2. Estructura proteica .....	27
3.3. Función biológica .....	29
4. El papel de la interacción CD40-CD154 .....	30
4.1. Regulación en la actividad APC .....	30
4.2. Activación de linfocitos T .....	31
4.3. Diferenciación de linfocitos T .....	31
4.4. Función efectora de monocitos y macrófagos .....	32
4.5. Activación de células NK .....	32
4.6. Extravasación de leucocitos .....	32
4.7. Aterosclerosis .....	33
4.8. Autoinmunidad .....	33
5. Activación B dependiente de T .....	33
6. Activación linfocitaria en AR .....	34
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
1. Estudio 1. Expresión de CD23 y CD154 en pacientes con AR .....	41
1.1. Sujetos de estudio .....	41
1.2. Aislamiento de células mononucleares .....	41
1.3. Preparación del tejido sinovial .....	42
1.4. Análisis fenotípicos .....	42
1.4.1. Marcajes extracelulares .....	42
1.4.2. Citometría de flujo .....	43
1.4.3. Inmunohistoquímica de membrana sinovial .....	43
1.5. Análisis funcionales .....	45
1.5.1. Estudio de moléculas de activación .....	45
1.5.1.1. Ensayo de inducción de CD23 en linfocitos B de SP .....	45
1.5.1.2. Ensayo de inducción de CD154 en linfocitos Th .....	46

2. Estudio 2. Efecto del tratamiento con mAb anti-TNF $\alpha$ en la expresión de CD23 y CD154 en pacientes con AR .....	47
2.1. Sujetos de estudio .....	47
2.2. Aislamiento de células mononucleares .....	49
2.3. Obtención de células de amígdala .....	49
2.4. Estudio de moléculas de activación .....	49
2.4.1. Ensayo de inducción de CD23 en linfocitos B de SP .....	49
2.4.2. Ensayo de inducción de CD154 en linfocitos T de SP .....	50
2.5. Cuantificación de TNF $\alpha$ en suero .....	51
2.6. Cuantificación de ICC-TNF $\alpha$ en suero .....	51
2.7. Ensayo de inducción de CD23 en linfocitos B de amígdala .....	51
3. Análisis estadístico .....	52

## **RESULTADOS** .....

1. Estudio 1. Expresión de CD23 y CD154 en pacientes con AR .....	54
1.1. Estudio de moléculas de activación .....	54
1.1.1. Análisis de la expresión de CD23 en condiciones basales .....	54
1.1.2. Inducción de la expresión de CD23 a través de señales sobre los linfocitos T .....	56
1.1.3. Mecanismos implicados en la inducción de la expresión de CD23 a través de señales sobre los linfocitos T .....	57
1.1.4. Análisis de la expresión de CD154 en condiciones basales .....	60
1.1.5. Inducción de la expresión CD154 .....	61
1.1.6. Co-cultivos con linfocitos T de LS .....	64
1.2. Inmunohistoquímica de MS .....	66
2. Estudio 2. Efecto del tratamiento con mAb anti-TNF $\alpha$ en la expresión de CD23 y CD154 en pacientes con AR .....	67
2.1. Estudio de moléculas de activación .....	67
2.1.1. Análisis de la expresión de CD23 en los linfocitos B de SP .....	67
2.1.2. Análisis de la expresión de CD154 en los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	71
2.2. Cuantificación de TNF $\alpha$ .....	72
2.3. Cuantificación de ICC-TNF $\alpha$ .....	73
2.4. Análisis de la expresión de CD23 en los linfocitos B de amígdala .....	74

## **DISCUSIÓN** .....

## **CONCLUSIONES** .....

## **BIBLIOGRAFÍA** .....

# **ABREVIATURAS**

AB:	Suero humano AB
APC:	Célula presentadora de antígeno
AR:	Artritis reumatoide
BSA:	Albúmina de suero bovino
CD:	Grupo (cluster) de diferenciación
CTL:	Linfocitos T citotóxicos
E <sup>-</sup> :	Linfocitos no roseteados
E <sup>+</sup> :	Linfocitos roseteados
Fc:	Fragmento cristizable de las inmunoglobulinas
FCS:	Suero de ternera fetal
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
FR:	Factor reumatoide
h:	Horas
HLA:	<i>Human leukocyte antigen</i> (MHC)
ICC:	Inmunocomplejos circulantes
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
KDa:	Kilodalton
LES:	Lupus eritematoso sistémico
LS:	Líquido sinovial
LT:	Linfotoxina
mAb:	Anticuerpo monoclonal
MFI:	Intensidad de fluorescencia media
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad
min:	Minutos
ml:	Mililitros
MS:	Membrana sinovial
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Proteína C reactiva
PE:	Ficoeritrina
PMA:	Ester de forbol mirístico
rpm:	Revoluciones por minuto
SD:	Desviación estándar
SFMC:	Células mononucleares de líquido sinovial
SP:	Sangre periférica
SRBC-N:	Eritrocitos de carnero tratados con neuraminidasa
Th:	Linfocitos T cooperadores
TNF $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TNFR:	Receptor del TNF



# **INTRODUCCIÓN**

# 1. ARTRITIS REUMATOIDE

## 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida (Goto M, 1999), caracterizada por inflamación articular crónica y recurrente. Presenta una incidencia de 1 a 3% en la población adulta, con una relación de mujeres a varones de 3:1 (Alarcon GS, 1995). Aunque existe una amplia gama de manifestaciones sistémicas en esta enfermedad, la alteración característica de la AR es una sinovitis inflamatoria persistente que afecta principalmente a las articulaciones periféricas con una distribución simétrica. Un signo característico de la enfermedad es la capacidad de la inflamación sinovial para producir una destrucción del cartílago articular con erosiones óseas y deformidades articulares en fases posteriores. A pesar de su potencial destructor, la evolución de la AR puede ser muy variable. Algunos pacientes pueden presentar únicamente un cuadro oligoarticular de breve duración con lesiones articulares mínimas, mientras que otros pacientes padecen una poliartritis progresiva e imparable que evoluciona hacia la aparición de deformidades articulares importantes. La enfermedad tiene un inicio característico en las articulaciones pequeñas de manos y pies, y progresa de manera centripeta y simétrica, siendo frecuentes las deformidades de estas articulaciones a menudo incapacitantes. Las manifestaciones extraarticulares también son características en la AR y, a menudo, originan morbilidad significativa (Gay S, 1999).

## 1.2. ETIOLOGÍA

La etiología de la AR es desconocida y probablemente no haya una sola causa sino que tenga un origen multifactorial. Los hipotéticos factores implicados en su etiología son:

### 1.2.1. Factores genéticos

La influencia de los factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad se ha puesto de manifiesto por:

#### 1.2.1.1. Estudios familiares

Se ha comprobado un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad entre los familiares de pacientes con AR (Grubb R et al, 1999). La implicación de factores genéticos está apoyada por el estudio de AR en hermanos gemelos (Silman AJ et al, 1993),

observándose una mayor incidencia de la enfermedad entre gemelos monocigotos que entre gemelos dicigotos.

#### *1.2.1.2. Marcadores genéticos*

Se ha demostrado una predisposición genética a la enfermedad al observarse una asociación con los genes del sistema HLA clase II (HLA-DR) (Albani S et al, 1992) (Weyand CM et al, 1992a) (Evans TI et al, 1995) (Thomson W et al, 1999). Esta asociación es sólo con determinados alelos DR, que codifican una secuencia polipeptídica de la tercera región hipervariable de las cadenas beta y que es compartida por varios subtipos de DR4 (Dw4, Dw14, Dw15) y por DR1.

#### *1.2.1.3. Influencia de los factores genéticos en la susceptibilidad y/o gravedad de la enfermedad*

A pesar de lo descrito anteriormente no se ha establecido claramente si los factores genéticos determinan por sí mismos un aumento de la susceptibilidad para desarrollar AR, o si influyen en un desarrollo de la enfermedad más grave. Sí parece que las moléculas de HLA influyen en la gravedad de la enfermedad, pero no en la predisposición a padecerla (Weyand CM et al, 1992b).

### **1.2.2. Factores del huésped**

#### *1.2.2.1. Factores endocrinológicos*

La mayor incidencia de AR en mujeres, y su aparición antes de la menopausia, sugiere una influencia del sistema reproductor y de los factores hormonales en el desarrollo de la enfermedad. Resulta interesante resaltar la influencia del embarazo por sí mismo sobre el riesgo de desencadenar la enfermedad en el período postparto, así también destacar la atenuación, e incluso remisión, durante el embarazo de una AR establecida y el posterior rebrote de ésta en el período postparto. Los fenómenos hormonales también se han puesto de manifiesto en varios estudios (Ahmed SA et al, 1985), demostrando que las mujeres que padecen AR tienen un déficit relativo de andrógenos, con niveles menores de testosterona. Así mismo, en hombres con AR también se ha comprobado que tienen unos niveles de testosterona menores.

#### *1.2.2.2. Sistema inmune del huésped*

La alteración de la función inmune puede contribuir a la enfermedad. Se ha comprobado que los individuos con AR tienden a padecer mayor cantidad de enfermedades autoinmunes asociadas (Berthelot JM et al, 1996), con la consiguiente aparición de diversos autoanticuerpos como el factor reumatoide (FR, autoanticuerpo dirigido contra la

región Fc de la IgG), como los anticuerpos anticitokeratina (AKA), anticuerpos anti-RA-33 y el aumento de los anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos anti-SS-a, etc.

### **1.2.3. Factores externos**

#### *1.2.3.1. Agentes infecciosos*

Se ha sugerido que la AR es una manifestación de la respuesta del huésped con susceptibilidad genética a un agente infeccioso ubicuo (Wollenhaupt J et al, 1998). Entre los diferentes microorganismos propuestos se encuentran *Mycoplasma*, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, parvovirus B19, virus de la rubeola y herpes virus 6. El proceso por el que el agente infeccioso podría desencadenar la artritis inflamatoria crónica es también tema de controversia (Firestein GS et al, 1987). Una de las posibilidades sería la infección persistente de las estructuras articulares o la retención de los productos microbianos en los tejidos sinoviales, que generaría una respuesta inflamatoria crónica. Otra alternativa sería que los microorganismos o la respuesta a ellos indujera una reacción inmunitaria contra componentes de la articulación, así el microorganismo infeccioso saturaría el huésped de determinantes con reacción cruzada, expresados en la superficie articular como consecuencia de la “similitud molecular”. Los estudios más recientes se han centrado en la posible importancia de los “superantígenos” (Paliard X et al, 1991) (Kotzin BL et al, 1993) producidos por diversos microorganismos, los cuales son proteínas con capacidad de unión a las moléculas HLA-DR y a determinados segmentos V $\beta$  del receptor heterodimérico del linfocito T. Sin embargo, no existe ninguna prueba concluyente de que éstos o determinados agentes infecciosos desencadenen la aparición de la AR.

#### *1.2.3.2. Situación socioeconómica*

Aunque diversos estudios (Pincus T et al, 1986) han demostrado que un nivel socioeconómico bajo se relaciona con una peor evolución de la enfermedad, no existen evidencias sobre la influencia del estilo de vida del paciente y la incidencia de la enfermedad.

Lo más probable es que ninguno de estos factores sea el único causante de la enfermedad, sino que la combinación de todos ellos determine el desarrollo de la AR y actúen también como moduladores de la enfermedad.

### 1.3. ANATOMÍA PATOLÓGICA

La lesión microvascular y el aumento en el número de células de revestimiento sinovial parecen ser las lesiones más tempranas en la sinovitis reumatoide. Otras lesiones frecuentes son el nódulo y la vasculitis reumatoide.

#### 1.3.1. Sinovitis reumatoide

Histológicamente la membrana sinovial (MS) de la AR se asemeja a un órgano linfoide. Macroscópicamente se observa una MS congestionada, gruesa y edematosa con apariencia de membrana aterciopelada y plegada. Microscópicamente la lesión inicial se localiza en los capilares y pueden distinguirse dos fases:

- fase inicial: presenta tumefacción de las células endoteliales con depósito de constituyentes plasmáticos y fibrina. Posteriormente se forma un exudado y se edematiza la MS, con congestión vascular e infiltración celular, inicialmente de células polimorfonucleares y, más tarde, linfocitos y células plasmáticas (Palmer DG, 1995).

- fase establecida: la capa celular superficial sufre un proceso de proliferación (Iannone F et al, 1994) e hipertrofia con formación de vellosidades (*pannus*) (Zvaifler NJ et al, 1994). El tejido sinovial presenta un aspecto de granulación compuesto de fibroblastos, vasos sanguíneos y células inflamatorias. Dicho tejido infiltra toda la superficie articular y es el responsable, junto con los mediadores del proceso inflamatorio, del daño articular.

#### 1.3.2. Nódulo reumatoide

Esta lesión es la más característica, aunque no exclusiva, de la enfermedad. Aparecen en el 20-30% de los pacientes con AR (Elewaut D et al, 1998). Habitualmente surgen sobre estructuras periarticulares, superficies extensoras u otras zonas sujetas a presión mecánica, aunque pueden aparecer en cualquier parte, como la pleura y las meninges. Los nódulos varían en cuanto a su tamaño y consistencia, y no suelen ser sintomáticos, aunque en ocasiones se rompen por traumatismos o se infectan. Casi de forma invariable aparecen en pacientes con FR circulante. Desde el punto de vista anatomopatológico, se pueden distinguir tres zonas:

- a) zona central: material necrótico que comprende fibrillas de colágeno, filamentos no colágeno y restos celulares que tiñen como un material amorfo con eosina.

- b) zona media: con macrófagos en empalizada que expresan antígenos HLA-DR.
- c) zona externa: tejido de granulación periférico constituido por fibroblastos, linfocitos y células plasmáticas.

### **1.3.3. Vasculitis reumatoide**

Forma parte de la patología extraarticular de la AR, afecta a vénulas y arterias de mediano y pequeño calibre de casi cualquier órgano o sistema. Se observa en pacientes con AR grave y títulos elevados de FR circulante. En esta patología todas las capas de la pared del vaso pueden estar infiltradas por linfocitos y se encuentran depósitos de IgG, IgM y C3.

## **1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

### **1.4.1. Síntomas y signos**

La edad habitual de inicio de la sintomatología es entre los 20 y los 40 años, comenzando en la mayoría de los casos por las manifestaciones articulares; sin embargo, algunos individuos desarrollan primero manifestaciones extraarticulares tales como fatiga, debilidad generalizada, pérdida de peso y anorexia, hasta que se hace patente la sinovitis (Persselin JE, 1991). Los síntomas específicos aparecen habitualmente de forma gradual con una afectación poliarticular, en especial de manos, muñecas, rodillas y pies, por lo general de forma simétrica.

#### *1.4.1.1. Manifestaciones articulares*

Los pacientes experimentan rigidez y dolor articular que, en general, es más agudo por la mañana y que mejora a lo largo del día. Estos síntomas se acompañan de inflamación articular, aumento de temperatura, eritema y dolor a la palpación. El dolor articular ocasiona espasmo muscular, limitación de movimiento y, en casos avanzados, contracciones musculares y anquilosis con deformidad articular permanente. La artritis es simétrica, e incluye tanto las pequeñas articulaciones de manos y pies, como las grandes articulaciones (rodillas, caderas, codos, tobillos y hombros), aunque en general, estas últimas se afectan más tarde en el curso de la enfermedad. Es habitual la inflamación periarticular con tendinitis y tenosinovitis, lo que origina debilitamiento de tendones, ligamentos y estructuras de apoyo.

#### 1.4.1.2. Manifestaciones extraarticulares

La AR es una enfermedad sistémica que produce diferentes manifestaciones extraarticulares. Como norma general, aparecen en pacientes con títulos elevados de FR circulante.

- Nódulos reumatoides: el 20-30% de los pacientes presentan nódulos subcutáneos o subperiósticos, llamados nódulos reumatoides, que tienden a desarrollarse durante las fases activas de la enfermedad y se forman subcutáneamente y a lo largo de las vainas de los tendones. Se piensa que la aparición de estos nódulos constituye la etapa tardía de la evolución de un proceso de vasculitis, quizás inducida por el depósito de inmunocomplejos circulantes (ICC).

- Vasculitis: puede afectar a casi cualquier órgano o sistema. Se observa en pacientes con AR grave y títulos elevados de FR. En la AR se presentan varios tipos de vasculitis, siendo la más frecuente la vasculitis obliterante de los pequeños vasos, que induce neuropatía periférica.

- Manifestaciones pleuropulmonares: son más frecuentes en los varones, consisten en pleuritis, neumonitis, fibrosis intersticial, nódulos pleuropulmonares y arteritis.

- Manifestaciones cardiacas: las más frecuentes son pericarditis, miocarditis e insuficiencia valvular, generalmente son asintomáticas.

- Manifestaciones oculares: el proceso reumatoide afecta al ojo en menos del 1% de los pacientes. Las dos manifestaciones principales son episcleritis, que suele ser leve y transitoria, y escleritis, que afecta a las capas profundas del ojo y constituye un trastorno inflamatorio más grave. El síndrome de Sjögren (queratoconjuntivitis seca y xerostomía) se presenta hasta en un 30% de los pacientes con AR.

- Manifestaciones neurológicas: la AR suele respetar el sistema nervioso central de forma directa, aunque la vasculitis puede causar neuropatía periférica.

- Síndrome de Felty: es un complejo sintomático formado por AR crónica, esplenomegalia y neutropenia y, en ocasiones, anemia y trombocitopenia. Los posibles mecanismos de las anomalías hematológicas apreciadas en estos sujetos pueden estar relacionados con la existencia de anticuerpos anti-células madre y anticuerpos anti-granulocitos y con el secuestro esplénico de células polimorfonucleares recubiertas de ICC. Este síndrome casi siempre se desarrolla en individuos con altos títulos de FR y nódulos reumatoides, aunque la AR con frecuencia es inactiva.

- Osteoporosis: su aparición secundaria es frecuente y se puede agravar por el tratamiento con corticoides y por la inmovilización.

- Complicaciones: la AR es la causa más frecuente de amiloidosis secundaria en los países desarrollados, se manifiesta en forma de proteinuria y/o insuficiencia renal. Estos pacientes tienen incrementado el riesgo de desarrollar infecciones gínitourinarias y broncopulmonares. Entre los factores que se han implicado en este aumento de las infecciones estarían los corticoides y los inmunosupresores utilizados en el tratamiento, una disminución de la capacidad fagocítica y, en general, una disminución de la resistencia ante gérmenes patógenos.

#### **1.4.2. Datos de laboratorio**

No existe ninguna prueba específica para el diagnóstico de AR.

##### *1.4.2.1. Factor reumatoide*

Su presencia no es específica de la AR pero es la característica inmunológica más importante (Chen PP et al, 1987). El FR es un autoanticuerpo dirigido contra determinantes antigénicos localizados en la porción Fc de la IgG2 e IgG3 humanas. La presencia de FR no establece el diagnóstico de la AR (Mannik M et al, 1988), aunque puede tener importancia en el pronóstico, ya que los pacientes con títulos elevados suelen presentar una afectación más grave, progresiva y con manifestaciones extraarticulares. El FR se detecta de forma constante en los pacientes con nódulos o vasculitis reumatoide.

##### *1.4.2.2. Hemograma*

La anemia normocrómica y normocítica y la trombocitosis son frecuentes en los individuos con la enfermedad activa. Se supone que refleja una alteración de la eritropoyesis. En la médula ósea se puede detectar grandes acumulaciones de hierro. El recuento linfocitario suele ser normal, aunque puede haber una leucocitosis leve.

##### *1.4.2.3. Reactantes de fase aguda*

Generalmente se encuentra elevada la velocidad de sedimentación globular, correlacionándose el grado de elevación con la actividad de la AR. La proteína C reactiva (PCR) y la ceruloplasmina presentan valores altos, que se correlacionan con la actividad de la enfermedad y con la probabilidad de lesión articular progresiva.

##### *1.4.2.4. Análisis de líquido sinovial (LS)*

Confirma la presencia de artritis inflamatoria, aunque ninguna de las alteraciones observadas es específica. Este líquido suele ser turbio, con disminución de la viscosidad, aumento del contenido proteico y una ligera disminución o normalidad en la concentración de glucosa. El recuento leucocitario oscila entre 5.000 y 20.000/ml, de los cuales dos tercios de las células son polimorfonucleares que descargan enzimas lisosómicas en el LS.



El complemento hemolítico total, el C3 y el C4 están muy disminuidos en el LS en relación con la concentración proteica total, lo que se debe a la activación de la vía clásica del complemento por ICC producidos localmente.

### 1.4.3. Datos radiológicos

En las fases iniciales de la enfermedad, las radiografías de las articulaciones afectadas no suelen ser útiles para establecer el diagnóstico. En ellas se observa lo que ya es evidente en la exploración física, es decir, signos de tumefacción de partes blandas y de derrame articular. A medida que evoluciona la enfermedad, las alteraciones radiológicas se hacen más pronunciadas, aunque ninguna de ellas es diagnóstica de AR. El valor principal de la radiografía consiste en determinar la intensidad de la destrucción del cartílago articular y de la erosión ósea, especialmente al controlar el tratamiento de la enfermedad con fármacos modificadores del curso de la enfermedad (*DMARDs*) o bien con intervención quirúrgica. Otras técnicas de imagen, como la gammagrafía ósea con difosfonatos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  y la resonancia magnética nuclear detectan cambios inflamatorios iniciales, pero rara vez se requieren en la valoración sistemática de los enfermos con AR.

## 1.5. CARACTERÍSTICAS INMUNOLÓGICAS

No se conoce el mecanismo exacto mediante el cual se produce la destrucción ósea y cartilaginosa. Aunque el LS contiene diferentes enzimas que en principio son capaces de degradar el cartílago, la mayor parte de la destrucción se produce en yuxtaposición a la MS inflamada, o *pannus*, que se extiende hasta cubrir el cartílago articular. Este tejido de granulación vascular está formado por fibroblastos proliferantes, vasos sanguíneos de pequeño tamaño y un número variable de células mononucleares que producen una gran cantidad de enzimas de degradación, como colagenasa y estromelisin, que facilitan el daño tisular. Las citocinas IL1 y TNF $\alpha$  (Ksontini R et al, 1998) desempeñan un papel importante en la estimulación de las células para la liberación de colagenasa y de otras proteasas neutras (Brennan FM et al, 1998). Estas dos citocinas activan también a los condrocitos *in situ*, estimulándolos para producir enzimas proteolíticas que pueden degradar localmente el cartílago. Finalmente, ambas citocinas pueden contribuir a la desmineralización local del hueso a través de la activación de los osteoclastos. La prostaglandina E<sub>2</sub> producida por fibroblastos y macrófagos, también contribuye a la

desmineralización ósea. Es probable que la vía final de la erosión ósea implique la activación de los osteoclastos que están presentes en grandes cantidades en estas zonas. Las manifestaciones generales de la AR se explican por la liberación de moléculas inflamatorias del tejido sinovial, entre las que se encuentran IL1, TNF $\alpha$  e IL6. Es probable que estas moléculas contribuyan a muchas de las manifestaciones de la AR activa, como el malestar general, la fatiga y el aumento de los reactantes séricos de fase aguda. La importancia del TNF $\alpha$  queda subrayada por el rápido alivio de los síntomas tras la administración de un anticuerpo monoclonal frente a TNF $\alpha$  en los pacientes con AR (Feldmann M et al, 1995-96). Además, los ICC producidos dentro del tejido sinovial, que entran en circulación, probablemente originan otras manifestaciones de la enfermedad como la vasculitis sistémica.

Las alteraciones anatomopatológicas en la AR evolucionan durante toda esta enfermedad crónica. La alteración inicial parece ser una respuesta inflamatoria inespecífica que se inicia por un estímulo desconocido. Más tarde se produce una respuesta inicial de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que amplifica y perpetua la inflamación (Panayi GS et al, 1992). La presencia de linfocitos T activados (Thomas R et al, 1996) puede inducir una estimulación policlonal de linfocitos B y la producción local de FR. A medida que se produce la lesión tisular, se ponen de relieve autoantígenos adicionales y la naturaleza de la respuesta de los linfocitos T se amplía en forma de clones adicionales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que son reclutados en el foco inflamatorio (Striebich CC et al, 1998). Finalmente, como resultado de la exposición persistente al medio inflamatorio, se altera la función de los fibroblastos sinoviales, que pueden adquirir un potencial destructivo ya sin necesidad de estimulación por parte de los linfocitos T o de los macrófagos.

En la MS, la célula infiltrante predominante es el linfocito T (Dolhain RJ et al, 1998). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> predominan sobre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y suelen hallarse muy próximos a los macrófagos HLA-DR<sup>+</sup> y a las células dendríticas. En el tejido sinovial se ha observado un número creciente de linfocitos T  $\gamma\delta$ , si bien sigue siendo una población minoritaria y se desconoce su importancia en la AR (Goronzy JJ et al, 1998). La población principal de linfocitos T en la MS está constituida por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria (Cush JJ et al, 1992), que representan la mayoría de las células que se acumulan alrededor de las vénulas poscapilares (Davis LS et al, 1998). También se observan linfocitos T CD8<sup>+</sup> diseminados por el tejido. Ambas poblaciones expresan el antígeno de activación CD69 (Afeltra A et al, 1997). Además, la MS se caracteriza por la infiltración de un gran número

de linfocitos B, que se diferencian localmente hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estas células producen Ig policlonal y el FR que determina la formación local de ICC. Finalmente, los fibroblastos presentes en la MS presentan signos de activación debido a que producen diversas enzimas como colagenasa y catepsina que pueden degradar los componentes de la matriz articular. Estos fibroblastos activados son especialmente llamativos en la capa de revestimiento y en la interfase con el hueso y el cartílago (Lindhout E et al, 1999). Los osteoclastos también son abundantes en las zonas de erosión ósea.

La MS se caracteriza por la presencia de productos de secreción de los linfocitos activados, los macrófagos y los fibroblastos (Badolato R et al, 1996). La producción local de estas citocinas y quimiocinas parece explicar muchas de las manifestaciones anatomopatológicas y clínicas de la AR (Feldmann M et al, 1998). Estas moléculas efectoras comprenden las que proceden de los linfocitos T, como IL2, IFN $\gamma$ , IL6, IL10, GM-CSF y TNF $\alpha$ ; las que proceden de macrófagos activados, como IL1, TNF $\alpha$ , IL6, IL8, IL10, IL15, GM-CSF, CSF-macrofágico y TGF $\beta$ ; y las secretadas por otros tipos celulares de la MS, como los fibroblastos y las células endoteliales, que comprenden IL1, IL6, IL8, IL15, GM-CSF y CSF-macrofágico. La actividad de estas quimiocinas y citocinas parece explicar muchas de las características de la sinovitis reumatoide, como la inflamación tisular sinovial, la inflamación del LS, la proliferación sinovial y la lesión cartilaginosa y ósea, así como también las manifestaciones generales de la AR (Isomaki P et al, 1997). Además de la producción de moléculas efectoras que propagan el proceso inflamatorio, los factores que se producen localmente tienden a detener la inflamación, destacando los inhibidores específicos de la acción de las citocinas, como el TGF $\beta$ , que inhibe muchas de las características de la sinovitis reumatoide, como la activación y proliferación de los linfocitos T, diferenciación de los linfocitos B y la migración de células hacia la zona de inflamación.

Todas estas características han sugerido que la propagación de la AR es un fenómeno mediado inmunológicamente, aunque el estímulo inicial todavía no se ha caracterizado (Gaston JS, 1998). Un punto de vista es que el proceso inflamatorio en el tejido se debe a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que infiltran la MS (Padula SJ et al, 1986). Los linfocitos T producen diversas citocinas, entre otras, IFN $\gamma$  y GM-CSF, que activan a los macrófagos (Cutolo M et al, 1993) y aumentan, además, la expresión de las moléculas de HLA. Por otro lado, los linfocitos T producen diversas citocinas que fomentan la proliferación y diferenciación de

los linfocitos B hacia células plasmáticas (Goronzy JJ et al, 1995). La síntesis consiguiente de Igs y FR da origen a la aparición de ICC, con la activación posterior del complemento y la exacerbación del proceso inflamatorio, al producirse las anafilotoxinas C3a y C5a y el factor quimiotáctico C5a. Otra posibilidad es que se tratara de una respuesta persistente a células activadas, como podría ocurrir después de la infección por el virus de Epstein-Barr o de una respuesta a un antígeno o superantígeno extraños del tejido sinovial. Finalmente, la inflamación reumatoide podría reflejar una estimulación persistente de los linfocitos T por antígenos derivados de la MS que muestran una reacción cruzada con determinantes inducidos durante exposiciones previas a antígenos extraños o a microorganismos infecciosos.

Además de la inflamación crónica del tejido sinovial, se puede observar un proceso inflamatorio agudo en el LS. Este contiene más leucocitos polimorfonucleares que células mononucleares (Beacock-Sharp H et al, 1998). En la estimulación del LS pueden participar diferentes mecanismos, los ICC producidos a escala local pueden activar el sistema de complemento y generar anafilotoxinas y factores quimiotácticos. La producción local, por parte de los fagocitos mononucleares, de factores como IL1, TNF $\alpha$  y el leucotrieno B<sub>4</sub>, así como de productos derivados de la activación del complemento, estimula a las células endoteliales de las vénulas postcapilares y aumenta su eficacia de unión a las células circulantes, mientras que el TNF $\alpha$ , IL8, C5a y el leucotrieno B<sub>4</sub> estimulan la migración de los leucocitos polimorfonucleares hacia el tejido sinovial. Además, los mediadores vasoactivos como la histamina producida por las células que infiltran la MS también pueden facilitar la exudación de células inflamatorias hacia el LS (Buckley MG et al, 1997). Finalmente, los efectos vasodilatadores de la prostaglandina E<sub>2</sub> sintetizada localmente también pueden facilitar la llegada de células inflamatorias hacia la zona de inflamación. Una vez en el LS, los leucocitos polimorfonucleares pueden fagocitar ICC, produciendo metabolitos reactivos del oxígeno y otros mediadores inflamatorios, añadiendo más complejidad al proceso inflamatorio. Las citocinas producidas localmente, como TNF $\alpha$ , IL8 y GM-CSF, pueden estimular de forma adicional a los leucocitos polimorfonucleares (Lettesjö H et al, 1998). La producción de grandes cantidades de productos del ácido araquidónico a través de las vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, por parte de las células del tejido y LS, acentúa todavía más los signos y síntomas de la inflamación.

## **1.6. DATOS DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA**

Como apoyo al diagnóstico, el dato serológico más importante es el título elevado de FR, presente en más del 75% de los pacientes. Los factores reumatoides son inmunoglobulinas con especificidad para el fragmento Fc de la IgG. La mayoría de las técnicas de laboratorio detectan FR de IgM pentamérica, pero las propiedades del FR también se aprecian en la IgM monomérica, IgG e IgA.

Se dispone de varias pruebas para detectar el FR en el laboratorio. En la actualidad el método más utilizado es la prueba de fijación al látex, donde la gammaglobulina agregada (factor II de Cohn) se absorbe en las partículas de látex que se aglutina en presencia de FR. La prueba de fijación al látex no es específica pero es muy sensible, lo que origina una alta incidencia de resultados falsos positivos. La prueba de eritrocitos sensibilizados de carnero (prueba de Waaler-Rose) depende de la fijación de anticuerpos específicos, y es más específica que la valoración anterior. Los eritrocitos de carnero se recubren con anticuerpo de conejo contra eritrocitos de carnero. Los eritrocitos de carnero sensibilizados se aglutinan en presencia de FR.

Las nuevas técnicas, que tienen la propiedad de detectar FR de todos los isotipos incluyen radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia indirecta, inmunoanálisis enzimático (EIA, ELISA) y nefelometría con láser.

Es importante tener en cuenta que los resultados de una prueba de FR realizada con los procedimientos usuales de laboratorio no son concluyentes por sí solos en el diagnóstico de AR. El paciente seronegativo puede tener IgG, IgA o FR monomérico IgM. Por el contrario, la presencia de FR no es exclusivo de la AR, también se encuentra presente en sujetos con lupus eritematoso sistémico (LES, 30%), en un gran porcentaje de pacientes con síndrome de Sjögren (90%) y, en menor frecuencia en pacientes con esclerodermia o polimiositis.

Mediante la electroforesis de proteínas séricas se puede detectar un incremento de  $\alpha_2$ -globulina, hipergammaglobulinemia policlonal e hipoalbuminemia. A menudo, se observan en la vasculitis crioprecipitados de Igs. Los valores séricos del complemento en general son normales, pero pueden estar reducidos cuando hay vasculitis activa.

## **1.7. TRATAMIENTO**

La finalidad del tratamiento de la AR es aliviar el dolor, disminuir la inflamación, proteger las estructuras articulares, mantener o restablecer la función y controlar la afectación sistémica. En estudios recientes, se ha puesto de manifiesto que en un amplio porcentaje de casos la AR es una enfermedad grave, que cursa con una gran morbilidad e incremento de la mortalidad. En estos estudios, se ha podido observar que el pronóstico final de la enfermedad depende de forma esencial del rápido control del proceso inflamatorio. Estos datos han modificado la concepción terapéutica y actualmente se considera fundamental la introducción del tratamiento de fondo desde el inicio de la enfermedad (Aeschlimann AG, 1998).

Con esta nueva estrategia terapéutica se intenta ajustar el tratamiento a la agresividad de la AR, para lograr reducir de forma precoz la actividad inflamatoria de la enfermedad.

### **1.7.1. Fisioterapia**

Es vital en el tratamiento de los pacientes con AR un programa de terapia física, que debe consistir en un equilibrio apropiado de descanso y ejercicio, así como el uso de terapia de calor o frío, con la finalidad de mejorar el tono muscular, corregir las deformidades y aumentar la movilidad muscular.

### **1.7.2. Tratamiento con fármacos**

Aunque no existe consenso sobre qué fármacos deben utilizarse y en qué orden, la mayoría de los estudios indican que el tratamiento debe ser individualizado y que es preferible empezar por las terapias menos tóxicas excepto en los pacientes con enfermedad progresiva y de mal pronóstico.

#### *1.7.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)*

Además de la aspirina, existen otros AINE que se pueden utilizar en el tratamiento de la AR (Abramson SB et al, 1989). Debido a la capacidad que tienen estos agentes de bloquear la actividad de la enzima ciclooxigenasa y, por tanto, la producción de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, poseen propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas.

#### *1.7.2.2. Fármacos modificadores del curso de la enfermedad (DMARDs, Disease-modifying antirheumatic drugs)*

Este grupo de agentes comprende metotrexato, azatioprina, sales de oro, D-penicilamina, antipalúdicos y sulfasalacina (Thompson PW et al, 1985). Producen mínimos e inespecíficos efectos directos de tipo anti-inflamatorio o analgésico y, por tanto, durante su administración se debe continuar la aplicación de AINE.

#### *1.7.2.3. Corticosteroides*

Su tratamiento está indicado en pacientes que no responden a AINE u otra terapia de remisión (Behrens TW et al, 1989).

### **1.7.3. Nuevos enfoques terapéuticos**

Los últimos estudios apuntan hacia la utilización de agentes biológicos como potenciales agentes terapéuticos de la AR (Lorenz HM et al, 1999) (Borigini MJ et al, 1995). Aquí se incluye el uso de anticuerpos monoclonales que interfieren el proceso de activación entre células presentadoras de antígeno (APC) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Billingham ME et al, 1990) (Abe T et al, 1998), la administración de citocinas anti-inflamatorias (Szekanecz Z et al, 1998) y el tratamiento que inhiba citocinas proinflamatorias (Elliot MJ et al, 1995). Figura 1.

Figura 1. Cooperación linfocito T-APC.

Las dianas de estos tratamientos son moléculas de la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o citocinas que como moléculas mensajeras controlan la función celular, diferenciación celular y la cooperación intercelular. Recientemente, se ha propuesto el tratamiento de enfermedades autoinmunes manipulando el balance Th1-Th2 (Muller B et al, 1998), basándose en el papel central de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la patogenia (Adorini L et al, 1996). Así mismo, se sabe que las moléculas de adhesión juegan un papel importante en la AR, por lo que se han realizado estudios con anticuerpos monoclonales contra éstas (Oppenheimer-Marks N et al, 1996). La expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y de sus ligandos en la superficie de leucocitos y de linfocitos circulantes juega un papel crítico en la migración celular a los tejidos inflamados (Laffón A et al, 1991). En un estudio realizado en pacientes con AR tratados con distintas dosis de anti-ICAM1 murino se vio mejoría en un 50% de los pacientes (Kavanaugh AF et al, 1994). El tratamiento con este monoclonal induce una disminución en la respuesta de los linfocitos T que se correlaciona con la mejoría clínica (Davis LS et al, 1995), aunque también se observan efectos colaterales en los pacientes (Kavanaugh AF et al, 1995).

Dos nuevas terapias, la terapia génica y la inducción de la apoptosis, han sido estudiadas como tratamiento en enfermedades autoinmunes. En el caso de la AR, las moléculas candidatas en la terapia génica incluyen antagonistas de citocinas como IL1ra (antagonista del receptor de IL1), sTNFR (receptor soluble de TNF), IL10, IL4 y sIL1R (receptor soluble de IL1) que actualmente se están estudiando en modelos animales. Así mismo, el conocimiento del papel de la apoptosis en el proceso autoinmune plantea la posibilidad de nuevos tratamientos (Kobayashi T et al, 1999) (Wakisaka S et al, 1998).

#### *1.7.3.1. Anticuerpos monoclonales*

##### 1. Tratamiento con anti-CD4:

En la AR se han realizado estudios con anticuerpos murinos y quimeras, primatizados o humanizados, con el fin de disminuir la inmunogenicidad y la linfocitopenia (Racadot E et al, 1992). Se han observado efectos adversos (Horneff G et al, 1991) (Moreland LW et al, 1996), por lo que la eficacia de este tratamiento es cuestionada (Keysser G et al, 1998).

##### 2. Tratamiento con anti-CD5:

En ensayos realizados con el monoclonal CD5IC no se observa correlación en la respuesta clínica (Strand V et al, 1993). La mayoría de los pacientes experimentan efectos adversos (Fishwild DM et al, 1994).



### 3. Tratamiento con anti-CD7:

Con el uso de una quimera del monoclonal CD7 se ha obtenido una modesta mejoría en la actividad de la enfermedad y frecuentemente presentan efectos adversos (Kirkham BW et al, 1992).

### 4. Tratamiento con anti-CD25 y terapia con IL2:

IL2R (receptor de IL2) está presente en linfocitos T activados, linfocitos B y monocitos. Todas estas células son importantes en el mantenimiento de los procesos autoinmunes. CD25 (cadena  $\alpha$  de IL2R) se expresa en los linfocitos T de sangre periférica y de líquido sinovial de pacientes con AR (Burmester GR et al, 1984). El tratamiento con un monoclonal anti-IL2R de rata (CAMPATH 6) proporciona resultados contradictorios y efectos adversos (Kyle V et al, 1989).

Así mismo, la respuesta observada en pacientes con AR tras el tratamiento con IL2 no fue satisfactoria (Moreland LW et al, 1995).

### 5. Tratamiento con anti-CD52:

CD52 es una molécula presente en todos los linfocitos T y B humanos, también en monocitos/macrófagos, pero no se expresa en células mieloides (Hale G et al, 1990). El monoclonal diseñado, CAMPATH-1H, fue administrado en pacientes con AR aunque no se obtuvieron resultados satisfactorios y sí efectos adversos (Weinblatt ME et al, 1995).

#### *1.7.3.2. Citocinas y anti-citocinas*

Las citocinas implicadas en la patogénesis de enfermedades autoinmunes se clasifican según su función en tres clases:

- a) moléculas que bloquean el efecto de las citocinas proinflamatorias: IL1ra
- b) citocinas anti-inflamatorias: IL4 e IL10
- c) citocinas proinflamatorias: IL1, TNF $\alpha$ , GM-CSF y quimiocinas (Rantes y MIP)

Respecto al tratamiento, no se conocen los efectos colaterales que podrían surgir a lo largo del tratamiento, además hay que tener en cuenta que las citocinas pueden tener distinto efecto en las diferentes enfermedades autoinmunes. Así pues, TNF $\alpha$  tiene un papel central como citocina proinflamatoria en la AR pero en el LES tiene un efecto protector, mientras que IL10 tiene efecto anti-inflamatorio en la AR pero en el LES aumenta la actividad de la enfermedad.

### 1. Tratamiento con anti-IL1:

La expresión y función biológica de IL1 es regulada por un complejo sistema de proteínas, como la enzima que convierte IL1, IL1ra y los dos receptores de IL1 tipo I y tipo II. IL1ra se une a los receptores de IL1 siendo un inhibidor competitivo de la unión de IL1. Tras los datos observados en experimentación animal se realizaron varios estudios con pacientes de AR (Campion GV et al, 1996) (Bresnihan B et al, 1996). Los estudios de biopsias de la MS demuestran una disminución de la población CD3<sup>+</sup> (Cunnane G et al, 1996).

### 2. Tratamiento con anti-IL6:

IL6, al igual que TNF $\alpha$  e IL1, es producida en gran concentración en el LS y tejido sinovial. Tras un estudio con anti-IL6 (B-E8), realizado en pacientes con AR, se vio que es tolerado y no presenta efectos colaterales (Wendling D et al, 1993).

### 3. Tratamiento con citocinas anti-inflamatorias:

En estudios *in vitro* se ha comprobado que IL10 detiene la destrucción de cartílago inducida en células mononucleares estimuladas con antígeno y que IL4 tiene un efecto aditivo. IL10 tiene también un efecto estimulador en la síntesis de prostaglandinas e IL4 es un factor de crecimiento de las células Th2. Estos datos apoyan su uso en el tratamiento de la AR (Van Roon JAG et al, 1996).

### 4. Tratamiento con IFN $\gamma$ :

Su uso en pacientes con AR ofrece dudas respecto a los resultados obtenidos (Lemmel EM et al, 1988) (Machold KP et al, 1992) (Veys EM et al, 1997).

### 5. Tratamiento con anti-TNF $\alpha$ :

En la AR se ha demostrado que la presencia de citocinas proinflamatorias está aumentada en las articulaciones inflamadas y en el tejido sinovial, TNF $\alpha$  e IL1 merecen especial atención ya que sus propiedades proinflamatorias se relacionan con los procesos de destrucción de tejido en la AR (Miossec P et al, 1997) (Robak T et al, 1997) (Steiner G et al, 1999). Ambas citocinas activan a las células endoteliales promoviendo la expresión de moléculas de adhesión y la consiguiente trans migración de leucocitos. Además, ambas citocinas aumentan la función fagocítica y secretora de granulocitos, y aumentan el crecimiento y producción de citocinas por los fibroblastos. Posiblemente, la propiedad más importante de TNF $\alpha$  e IL1 en la patogénesis de la AR es su capacidad de promover la reabsorción y destrucción del cartílago y hueso (Chu CQ et al, 1991), estimulando la producción de metaloproteinasas por los fibroblastos y suprimiendo la

síntesis de componentes de la matriz por las células del tejido conectivo (Firestein GS et al, 1992) (Shingu M et al, 1993). Basándose en estudios de terapia realizados con anti-TNF $\alpha$  en modelos animales, los datos demuestran que tanto TNF $\alpha$  como sus dos receptores (p55 y p75) regulan en la MS la unión cartilago/*pannus* (Husby G et al, 1988) (Deleuran BW et al, 1992) y basado en la presencia de elevados niveles de TNF $\alpha$  y de la forma soluble de los dos receptores en el LS de pacientes con AR (Tetta C et al, 1990), los agentes bloqueantes de TNF $\alpha$  fueron introducidos en el tratamiento de la AR.

Utilizando una quimera humana neutralizante de TNF $\alpha$  (cA2) en pacientes con AR se vio una rápida mejoría en la velocidad de sedimentación globular (VSG) y en la PCR (Elliott MJ et al, 1993). Respecto al mecanismo de acción del tratamiento con anti-TNF $\alpha$  en AR, en otro estudio (Lorenz HM et al, 1996) se vio que la concentración de IL1 $\beta$ , IL6 y CD14 soluble disminuyó significativamente, también se vio una disminución de las moléculas solubles de ICAM-1. Todo ello indica que este tipo de tratamiento afecta a la migración celular.

También se ha utilizado una construcción del receptor soluble de TNF $\alpha$  (p55), formado por una proteína glicosilada con dos TNFR (p55) unidos a una IgG-1 Fc humana (Sander O et al, 1996).

Se han observado efectos autoinmunes, como la aparición de ANAs, tras una terapia con citocinas, tanto en el caso del tratamiento con IFN $\gamma$  (Ehrenstein MR et al, 1993), como en el tratamiento con el monoclonal cA2 (Charles PJ et al, 1995).

## 2. ACTIVACIÓN FISIOLÓGICA DEL LINFOCITO T

La activación del linfocito T por un antígeno específico se produce tras un complejo proceso de interacciones celulares. Un péptido antigénico, unido a moléculas de MHC en APCs, es reconocido por linfocitos T que expresan el TCR específico para ese antígeno. Otras moléculas participan en esta respuesta. Estas moléculas, denominadas accesorias, favorecen la interacción entre células T y APCs. Así LFA-1 (CD11a/CD18) interacciona con ICAM-1 (CD54) o con ICAM-2 (CD102) o ICAM-3 (CD50); CD2 con LFA-3 (CD58); y CD4 con MHC de clase II o CD8 con MHC de clase I. Las moléculas accesorias

aumentan la estabilidad en la interacción entre células T y APCs y promueven la activación del linfocito T al prolongar la transducción de señal.

El reconocimiento de antígeno, junto con la participación de las moléculas accesorias, desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el interior celular. Las moléculas accesorias que participan en la activación T son CD2, CD28 (Van Lier R et al, 1991), CD43 (Bazil V et al, 1993), CD45 (Stamenkovic I et al, 1991), LFA-1 (Desroches C et al, 1991), CD4 (Hara M et al, 1991) y CD8 (Veillette A et al, 1988). Tras el reconocimiento de antígeno se genera una señal que es amplificada en el interior celular por una serie de reacciones bioquímicas, cuyo resultado final es la inducción de genes que intervienen en funciones efectoras del linfocito T activado.

Cuando el linfocito T ha sido estimulado a través del complejo TCR/CD3 se produce una rápida activación de proteínas con actividad tirosina quinasa o tirosina fosfatasa (June CH et al, 1990) (Klausner RD et al, 1991). Una de las proteínas que inicia la cascada de activación es la molécula accesoria CD45, a través de su actividad fosfatasa activa por defosforilación a dos proteínas quinasas de la familia de las Src denominadas p56<sup>lck</sup> (Lck) y p59<sup>fyn</sup> (Fyn) (McFarland ED et al, 1993). Tanto Lck, que interacciona con los correceptores CD4 y CD8 (Shaw AS et al, 1990) (Turner JM et al, 1990) como Fyn, asociada al receptor de la célula T (Sarosi GA et al, 1992), cuando se activan son capaces de fosforilar residuos de tirosina en las secuencias ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de las cadenas de CD3 (Iwashima M et al, 1994) (Van Oers NS et al, 1996). Las secuencias ITAM fosforiladas son sitio de unión, y a su vez de activación, de una proteína con actividad tirosina quinasa de la familia syk denominada Zap-70 (*Zeta-associated protein*) que se une a las cadenas  $\zeta$  del TCR (Chan AC et al, 1992). Este conjunto de quinasas activadas fosforilan a múltiples sustratos, entre ellos PLC $\gamma$  y MAPK, y se asocian a proteínas adaptadoras, como Vav o Cbl (Katzav S et al, 1994) (Fournel M et al, 1996) o a otras quinasas como PI3K (Vogel LB et al, 1993). PI3K activada fosforila fosfolípidos de membrana, generando segundos mensajeros que activan a PKC. PLC activada es reclutada en la membrana donde hidroliza el fosfolípido de membrana fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>). La hidrólisis de PIP<sub>2</sub> genera dos segundos mensajeros que amplifican la señal originaria producida por el TCR, inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (Noh DY et al, 1995). DAG, que permanece en la membrana es responsable de la activación de PKC y otras muchas proteínas con actividad serina quinasa (Szamel M et al, 1995).

IP<sub>3</sub>, generado tras la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, se une a los receptores de IP<sub>3</sub>, que se encuentran tanto en la membrana plasmática como en la membrana del retículo endoplasmático. Estos receptores, también fosforilados por la quinasa Fyn tras la estimulación del TCR, son canales de iones calcio que están habitualmente cerrados y al unirse a IP<sub>3</sub> se abren, liberándose el Ca<sup>2+</sup> al citoplasma (Berridge MJ, 1993). Este rápido incremento de calcio intracelular debe ser mantenido para que se produzcan la mayoría de las respuestas del linfocito T (Putney JW, 1990) (Fanger CM et al, 1995). El aumento de calcio actúa también como segundo mensajero, activa a múltiples quinasas y fosfatasas que dependen de calcio, como la calcineurina (Crabtree GR et al, 1994), para que fosforilen o defosforilen a diversas proteínas citoplasmáticas. Dentro de las múltiples proteínas que son fosforiladas por la PKC o por proteínas dependientes de calcio se encuentran diversos factores de transcripción nucleares, como NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) (Northrop JP et al, 1994), NF-κB (*nuclear factor of activated B cells*) o AP-1 (*activated protein-1*) (Loh C et al, 1996) (Baier-Bitterlich G et al, 1996). Estos factores nucleares se unen al promotor de los genes implicados, haciéndolos más atractivos a la RNA polimerasa. Como respuesta, el núcleo comienza a transcribir un conjunto de genes que permitirán al linfocito T desarrollar sus funciones efectoras (Rao A, 1994).

Alguno de estos genes codifican para proteínas que se inducen rápidamente tras activación, como CD69 o CD154. Estas proteínas son fundamentales en la señalización del estado funcional en que se encuentra la célula, como es el caso de CD69 (Sánchez-Mateos P et al, 1991), o bien para transmitir la señal de activación a otras células, como CD154 que se une a la proteína de membrana CD40 del linfocito B generando señales necesarias para el cambio de isotipo de las Igs (Yang Y et al, 1996). Otra consecuencia importante de la activación del linfocito T es la inducción de la producción de citocinas.

Además de la inducción prácticamente inmediata de estos genes, tras la activación del linfocito T se inicia la transcripción de toda una batería de genes que, de forma conjunta, ponen en marcha determinadas funciones efectoras. La proliferación celular al cabo de 2-3 días de los linfocitos T activados garantiza la expansión de los clones que han sido capaces de reconocer el antígeno exógeno, lo que ayuda a amplificar la respuesta inmune. Por otro lado, la activación de linfocitos T citotóxicos, es crucial para la defensa frente a patógenos intracelulares. Figura 2.

Figura 2. Activación intracelular del linfocito T.

### 3. FAMILIA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

El factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) fue descrito como el factor responsable de la necrosis hemorrágica inducida por lipopolisacárido (LPS) en tumores animales (Carswell EA et al, 1975). Más tarde se identificó como “caquectina”, factor responsable del debilitamiento en animales durante infecciones parasitarias (Beutler B et al, 1985). Tras clonar el cDNA y purificar la proteína se vio que TNF $\alpha$  está relacionado estructuralmente con la linfotoxina (Pennica D et al, 1984), un producto de linfocitos T activados que actualmente se denomina LT $\alpha$  (hasta hace poco se conocía también como TNF $\beta$ ). Aunque TNF $\alpha$  y LT $\alpha$  son producidas por distintos tipos celulares en respuesta a diferentes estímulos, reconocen los mismos receptores y pueden producir actividades biológicas similares.

TNF $\alpha$  y LT $\alpha$  fueron los primeros miembros identificados de una amplia familia de ligandos y receptores donde se incluye a CD30L (CD153), CD40L (CD154), 4-1BBL (TRAIL/Apo2L), CD27L (CD70), FasL y OX40L como miembros de la familia del TNF; y a TNFR, CD30, CD40, 4-1BB, CD27, Fas (CD95) y OX40 (CD134) como miembros de la familia del receptor de TNF. A excepción de LT $\alpha$ , todos los ligandos de la familia del TNF son sintetizados como proteínas de membrana de tipo II, formadas por un dominio extracelular C-terminal y dominios transmembrana e intracelular. La homología entre los miembros de esta familia es mayor en el dominio extracelular. La mayoría de los ligandos de la familia del TNF son proteínas de membrana, sólo LT $\alpha$ , TNF $\alpha$  y FasL son funcionales en su forma soluble (Nagata S, 1997).

Todos los miembros de la familia del receptor de TNF son proteínas de membrana de tipo I, presentan una homología parcial en el dominio extracelular que une ligando y que contiene varios dominios repetidos ricos en cisteína. Algunos receptores de esta familia comparten 80 aa (*death domain*) en el dominio intracelular, estos dominios participan en la generación de señales apoptóticas. (Figura 3 y tabla 1)

Tabla 1. Familia del factor de necrosis tumoral: receptores, sus ligandos y función principal.

\* receptor relacionado con la familia de TNFR pero los ligandos no se relacionan con la familia de TNF.

Receptor	Ligando	Función
TNFR I (p55)	TNF $\alpha$ y LT $\alpha$	Defensa, inflamación, muerte celular
TNFR II (p75)	TNF $\alpha$ y LT $\alpha$	Defensa, inflamación
LT $\beta$ R	LT $\alpha/\beta$	Desarrollo nódulo linfoide, muerte celular
CD40	CD154	Switch Ig, coestimulación T
CD27	CD27L (CD70)	Coestimulación T
CD30	CD30L (CD153)	Coestimulación T y B
OX40 (CD134)	OX40L	Coestimulación T
4-1BB	4-1BBL	Coestimulación T
CD95 (Fas/Apo1)	FasL/Apo1L	Muerte celular, activación NF $\kappa$ B, eliminación células T autorreactivas
DR4	TRAIL/Apo2L	Muerte celular
Apo3/DR3/WSL1/TRAMP	Apo3L	Muerte celular, activación NF $\kappa$ B
TRAMP	?	Activación NF $\kappa$ B, muerte celular
CAR1	?	Receptor virus sarcoma avian leukosis
HVEM	LIGHT y LT $\alpha$	Correceptor virus herpes simple
GITR	GITRL	Protección muerte celular
OPG	Factor dif osteoclastos	Regulación ósea
P75 NGFR	NGF*, neurotrofinas*	Diferenciación neuronal, muerte celular

Figura 3. Ligandos y receptores de la familia de TNF.



### 3.1. ESTRUCTURA GENÓMICA

El gen humano de TNF $\alpha$  se localiza en la región que codifica MHC de clase III en el cromosoma 6 (Spies T et al, 1986), flanqueado por los genes que codifican para LT $\alpha$  y LT $\beta$ . La expresión de estos tres genes está regulada de forma independiente aunque la organización genómica es similar. Cada uno de los genes está formado por cuatro exones de aproximadamente 3 Kb. Esta semejanza estructural sugiere que los genes de TNF $\alpha$ , LT $\alpha$  y LT $\beta$  provienen de un mismo gen ancestral por duplicación.

El análisis de los elementos reguladores transcripcionales en la región 5' del gen de TNF $\alpha$  ha llevado a la identificación de elementos importantes en la regulación de la expresión del gen de TNF $\alpha$ , sobre todo NF-kB (Makhatadze NJ, 1998). Además de la regulación a nivel de la transcripción, la síntesis de TNF $\alpha$  también está controlada a nivel del alargamiento del mRNA, procesamiento del mRNA y a nivel de la traducción. Otro sitio de regulación es la escisión proteolítica de la proteína de membrana TNF $\alpha$  que produce TNF $\alpha$  soluble. La localización del gen de TNF $\alpha$  dentro del *cluster* de los genes de MHC ha abierto la posibilidad de que el polimorfismo en este *locus* juegue un papel determinante en la susceptibilidad genética a padecer enfermedades autoinmunes e infecciones que se conocen ligadas al MHC. Especialmente, el polimorfismo en el promotor del gen de TNF $\alpha$  se ha asociado con enfermedades autoinmunes y el aumento en la producción de TNF $\alpha$  (Wilson AG et al, 1997) (Kaijzel EL et al, 1998), y a la susceptibilidad de padecer AR (Martínez A et al, 2000).

El gen de FasL está localizado en el cromosoma 1 humano, cerca del gen que codifica para OX40L. El gen FasL está formado por cinco exones, cuya organización genómica es similar a la de TNF $\alpha$ . El gen que codifica para CD154 en humanos se encuentra en el cromosoma X.

### 3.2. ESTRUCTURA PROTEICA

El TNF $\alpha$  humano, de 233 aa, es sintetizado como una proteína de membrana de 26 kDa biológicamente activa que puede unirse tanto a TNFR I como a TNFR II. Sin embargo, el TNF $\alpha$  de membrana activa preferentemente a TNFR II, lo que sugiere que esta forma y la soluble desempeñan distintas funciones (Grell M et al, 1995). La forma soluble, formada por 157 aa, deriva del precursor de membrana tras escisión proteolítica. La metaloproteasa

específica de este proceso (TNF $\alpha$  *converting enzyme* o TACE) es una proteína de membrana de 824 aa cuya porción catalítica es parte del dominio extracelular (Moss ML et al, 1997). TACE escinde la porción extracelular del precursor de TNF $\alpha$  entre Ala76 y Val77, dejando los dominios transmembranal e intracitoplasmático intactos. El resultado es un péptido de 157 aa que forma un homotrímero, característica importante en la unión a TNFR (Smith RA et al, 1987). Hay evidencias que indican que LT $\alpha$  y otros miembros de la familia de TNF $\alpha$  pueden unirse a los receptores como trímeros y que el sitio de interacción con el receptor está en la base de los trímeros (Banner DW et al, 1993).

Los fagocitos mononucleares son los mayores productores de TNF $\alpha$ , aunque se ha visto que otras células nucleadas son capaces de producirlo tras estímulo, como los linfocitos T (Th1 y Th2), linfocitos B, células NK, células del endotelio vascular, queratinocitos, células del músculo liso, mastocitos, neutrófilos, astrocitos y células gliales.

LT $\alpha$  es el único ligando de la familia del TNF $\alpha$  que es sintetizado como una proteína secretora convencional conteniendo una secuencia de péptido señal de escisión (Gray PW et al, 1984). LT $\beta$  y los demás miembros de la familia de ligandos del TNF $\alpha$  son sintetizados como proteínas de membrana de tipo II. La proteína secretada LT $\alpha$  forma un homotrímero, que reconoce los mismos receptores de superficie celular que TNF $\alpha$  (ver tabla 1 y figura 3). Sin embargo, LT $\alpha$  también puede formar un heterotrímero con LT $\beta$  (Browning JL et al, 1993), LT $\beta$  es una proteína de membrana tipo II que no es secretada y sirve de anclaje a LT $\alpha$  en la superficie celular cuando forma el heterotrímero LT $\alpha$ / $\beta$ . LT $\alpha$  y LT $\alpha$ / $\beta$  reconocen distintos receptores, por lo que no sorprende que desarrollen diferentes funciones biológicas. LT $\alpha$  se expresa en linfocitos B y T (preferentemente Th1) activados, posiblemente también en células NK, mientras que LT $\beta$  se expresa sólo en linfocitos.

La proteína FasL, de forma similar a TNF $\alpha$ , es sintetizada como proteína de membrana de tipo II, siendo liberada de la superficie celular tras escisión proteolítica por una metaloproteasa específica. Así pues, FasL existe de dos formas, una transmembranal de 40 kDa y otra soluble de 26 kDa (Nagata S et al, 1995). Esta proteína es producida por linfocitos T activados.

CD30L y 4-1BBL son proteínas de membrana de tipo II cuyo C-terminal (porción que se une al receptor) es homólogo a otros miembros de la familia del TNF. Ambas son glicoproteínas expresadas en una gran variedad de células activadas, incluyendo linfocitos T, linfocitos B, células mieloides, macrófagos y células dendríticas. CD30L está más

glicosilada que otros miembros de la familia, quizá reflejando la diferencia estructural de la molécula CD30.

CD154 es una glicoproteína de 33 kDa miembro de la familia del TNF. Su expresión es rápida y transitoria en la superficie de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y algunos CD8<sup>+</sup> activados, monocitos, células NK, mastocitos y basófilos. Es una proteína de membrana de tipo II con una secuencia homóloga a TNF $\alpha$  y una estructura terciaria similar al trímero TNF $\alpha$ .

### 3.3. FUNCIÓN BIOLÓGICA

Tanto CD30L como 4-1BBL inducen proliferación de los linfocitos T cuando se activa el TCR. Tras activar la molécula de CD30L aumenta la producción de IL8, se induce el “bursts” oxidativo y aumenta la producción de IL6 (Kyriakis JM et al, 1994).

De todas las citocinas, TNF $\alpha$  e IL1 tienen el más amplio espectro de actividades biológicas. Dado que el receptor de TNF $\alpha$  se expresa de forma ubicua no es de extrañar que la exposición de células y tejidos a TNF $\alpha$  produzca multitud de acciones biológicas (Darnay BG et al, 1997). No está bien determinado en qué actividades está fisiológicamente o pato-fisiológicamente implicado (Beutler BA, 1999), aunque diversos estudios clínicos con anticuerpos monoclonales anti-TNF $\alpha$  o construcciones de TNFR soluble proporcionan información constante. En la resistencia del huésped a infecciones por patógenos intracelulares el papel de TNF $\alpha$  es evidente (Pasparakis M et al, 1996). A pesar del efecto beneficioso en la resistencia a infecciones tras el modesto aumento en la producción de TNF $\alpha$  en el lugar de la infección, se ha comprobado que este aumento en órganos susceptibles a su toxicidad (ej. el cerebro) produce efectos adversos e incluso la muerte. Así pues, el papel de TNF $\alpha$  en la patogénesis del shock séptico es evidente (Tracey KJ et al, 1987). La implicación de TNF $\alpha$  como factor patogénico en enfermedades autoinmunes, especialmente en la AR (Borzi RM et al, 1993) y la enfermedad de Crohn, se ve avalada por los resultados obtenidos en estudios en pacientes con AR tratados con anticuerpos monoclonales anti-TNF $\alpha$  (Feldmann M et al, 1996). A pesar de la descripción original como “factor de necrosis tumoral”, es evidente el papel de TNF $\alpha$  en la resistencia al cáncer.

Otro miembro de esta familia, CD154, es esencial en la señalización de los linfocitos B tras interactuar con CD40 (Clark EA et al, 1994) promoviendo la activación de los linfocitos B (incluyendo la expresión de CD23), diferenciación y “switch” de Igs por parte

de éstos (Lederman SM et al, 1992b). La activación directa de CD154 genera señales coestimuladoras que regulan la producción de IL4 (Vilcek J et al, 1991) y la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) (Malinin NL et al, 1997).

#### 4. PAPEL DE LA INTERACCIÓN CD40-CD154

Las interacciones celulares juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune. Se han descrito moléculas que hacen estables estos contactos intercelulares y que transmiten señales coestimuladoras o apoptóticas. Entre ellas se encuentra la molécula CD40 expresada en linfocitos B y la molécula CD154 expresada en linfocitos T activados. Tras el uso de anticuerpos que bloquean la interacción CD40-CD154 se ha comprobado que estas moléculas median en la respuesta humoral dependiente de linfocitos T (Noelle RJ et al, 1992). También se ha visto que la mutación en el gen que codifica para CD154 en humanos provoca el desarrollo del síndrome de hiper-IgM, que se caracteriza por niveles elevados de IgM en la mayoría de los pacientes y bajos niveles de IgA, IgG e IgE, ausencia de centros germinales y la incapacidad de producir una respuesta humoral dependiente de linfocitos T (Callard RE et al, 1993) (Aruffo A et al, 1993). La generación de ratones *knockout* de CD40 y de CD154 pone asimismo de manifiesto la importancia de estas moléculas en la generación de la respuesta inmune humoral y celular (Xu J et al, 1994).

Por otro lado, se ha comprobado la participación de CD154 junto con el ligando de Fas en la inducción de la expansión clonal de células B que reconocen antígeno extraño. Asimismo, la expresión de CD154 induce la delección clonal de linfocitos B cuyo receptor ha sido desensibilizado por estimulación con antígenos propios o por no unirse antígeno al receptor del linfocito B (Rathmell JC et al, 1996).

CD40 no se expresa solamente en los linfocitos B, también se encuentra en otras células presentadoras de antígeno y otros tipos celulares, lo cual sugiere que la interacción CD40-CD154 puede ser importante en respuestas inmunes mediadas por células T, tanto en la iniciación como en fases efectoras, así como en el desarrollo de funciones efectoras de otras células que expresen CD40 (Van Kooten C et al, 1997).

#### 4.1. REGULACIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LAS APCs

Las interacciones entre linfocitos T y APC producen señales bidireccionales importantes en la activación de células T específicas y en la regulación inmune. El modelo de activación de linfocitos T (Janeway CA et al, 1994) postula el requerimiento de dos señales distintas, la interacción del TCR con MHC-péptido en la superficie de la APC y de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 en la superficie de la APC con CD28 presente en la superficie del linfocito T.

El papel de la interacción CD40-CD154 en los linfocitos B se ha comprobado en estudios *in vivo* e *in vitro*, viendo que regula la activación de las células B como APC (Wu Y et al, 1995). En otros tipos de APC, como las células dendríticas y los macrófagos, se ha visto también la importancia de esta interacción en la inducción de la actividad coestimuladora (Grewal IS et al, 1997). Así pues, parece que la interacción CD40-CD154 es importante en la activación de todas las APC, siendo crítica en la posterior activación de los linfocitos T.

#### 4.2. ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

Pacientes con hiper-IgM padecen infecciones por patógenos oportunistas, lo que sugiere que la respuesta de los linfocitos T es defectuosa en ausencia de la molécula CD154. La estimulación de APC con CD154 produce señales activadoras hacia los linfocitos T, por lo que esta deficiencia conlleva un fallo en la respuesta de los linfocitos T (Lederman S et al, 1992a).

#### 4.3. DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T

Los linfocitos Th1 producen IFN $\gamma$  y TNF $\beta$ , lo que activa a los macrófagos y potencia la respuesta inflamatoria, mientras que los linfocitos Th2 producen IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13 que promueven la formación de anticuerpos. Los factores que influyen en la diferenciación de los linfocitos Th hacia una subpoblación Th1 o Th2 se han conocido recientemente (Constant SL et al, 1997). Distintas citocinas, la afinidad antígeno-MHC y el tipo de APC se han implicado en este proceso. La expresión de moléculas coestimuladoras en APC y la producción de cofactores solubles, como IL6 e IL12, contribuyen al desarrollo Th (Rincon M et al, 1997). La interacción CD40-CD154 regula la activación de APC y

esto regula la actividad coestimuladora y la producción de citocinas, por lo que esta interacción es importante en la polarización de las subpoblaciones Th.

En estudios recientes se ha visto que la interacción CD40-CD154 regula la producción de IL12 por células dendríticas y macrófagos, IL12 es una citocina requerida en el desarrollo de la respuesta tipo Th1. También se ha visto que el tratamiento con anticuerpos anti-CD154 previene enfermedades autoinmunes de tipo Th1, ya que bloquea la secreción de IL12 y regula la expresión de IL4 (Stüber E et al, 1996).

#### **4.4. FUNCIÓN EFECTORA DE MONOCITOS Y MACRÓFAGOS**

Los macrófagos juegan un papel central en los procesos inflamatorios mediados por células T, promueven la respuesta inflamatoria y actúan como células efectoras mediando el daño tisular, también actúan como APC procesando y presentando antígenos a los linfocitos T. Tras el contacto celular entre los linfocitos T y los macrófagos, estos últimos son activados (Stout R et al, 1996). Previamente, se requiere una pre-activación de los linfocitos T lo que sugiere que las moléculas de superficie de los linfocitos T puedan estar implicadas. Así pues, parece que la interacción CD40-CD154 juega un papel en los procesos inflamatorios mediados por monocitos, regulando la producción de citocinas de los monocitos y promoviendo el rescate de la muerte celular programada en los lugares de inflamación (Kiener PA et al, 1995).

Señales derivadas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados son importantes en la activación de macrófagos para producir IFN $\gamma$  y nitritos (Tao X et al, 1993), por lo que el papel de la interacción CD40-CD154 en la activación de macrófagos parece evidente, más aún cuando esta interacción es necesaria en la producción de NO e IL12 por los macrófagos (Stout R, 1993).

#### **4.5. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK**

Además de las funciones conocidas en la destrucción de tumores, de células infectadas por virus y el efecto alogénico (Herberman RB, 1982), las células NK inducen la maduración de los linfocitos B, secreción de Igs y el cambio de isotipo mediante interacciones CD40-CD154 (Gray JD et al, 1995).

#### **4.6. EXTRAVASACIÓN DE LEUCOCITOS**

CD40 se expresa en células endoteliales de hígado, piel, tiroides, timo y pulmones (Yellin MJ et al, 1995), siendo además regulado por citocinas (Karmann K et al, 1995). Así pues, la interacción CD40-CD154 parece jugar un papel importante en la activación del endotelio vascular. Se ha visto (Springer TA, 1994) que la activación de CD40 con CD154 induce la expresión de CD62E, CD106 y CD54 en las células endoteliales humanas. Así pues, en la respuesta inflamatoria con extravasación de leucocitos, mediado por CD62E, CD54, CD106 y por quimiocinas como IL8, MCP-1 y MCP-1 $\alpha$ , participa la interacción mediada por CD40-CD154.

#### **4.7. ATEROSCLEROSIS**

Hay evidencias que relacionan a los linfocitos T activados y macrófagos con la formación de las placas inflamatorias ateroscleróticas, siendo cuestionado el papel de la autoinmunidad en la aterogénesis (Mach F et al, 1997). Se ha visto un número significativo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> presentes en las placas ateroscleróticas (Wick G et al, 1995), presentando la mayoría de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fenotipo de memoria. Se conoce la participación de células endoteliales, células del músculo liso y macrófagos en la aterosclerosis. CD40 se expresa en las células endoteliales humanas y la activación de esta molécula regula la expresión de moléculas de adhesión (Hollenbaugh D et al, 1995). Así pues, la expresión de CD154 en los linfocitos T presentes en las lesiones, junto a la expresión de CD40 en las células endoteliales, células del músculo liso o macrófagos podría regular la expresión de citocinas, metaloproteinasas o moléculas de adhesión, presentes normalmente en el ateroma humano (Laman JD et al, 1997).

#### **4.8. AUTOINMUNIDAD**

El papel de la señalización dependiente de contacto celular en el desarrollo de autoinmunidad (Harigai M et al, 1999) ha sido confirmado mediante el tratamiento con anticuerpos anti-CD154 en experimentación animal.

## **5. ACTIVACIÓN B DEPENDIENTE DE T**

La producción de anticuerpos por los linfocitos B efectores, en respuesta a proteínas antigénicas, es dependiente de linfocitos T cooperadores (Th). Para ello, los linfocitos B vírgenes o de memoria que se encuentran en reposo han de ser activados por un antígeno. Los linfocitos Th ( $CD4^+$ ) pueden diferenciarse en Th1, implicados en la activación de macrófagos y en Th2, responsables de la activación de linfocitos B. La respuesta mediada por anticuerpos frente a antígenos de tipo proteico requiere la cooperación de linfocitos Th2. Los linfocitos T y B implicados en este tipo de respuesta han de ser específicos para el mismo antígeno.

Tras la interacción del linfocito B, a través del BCR, con el antígeno para el que es específico, se activa parcialmente y expresa moléculas en su superficie, ej. receptores de citocinas. El complejo BCR-antígeno es internalizado, el antígeno es procesado y finalmente es presentado asociado al MHC de clase II. Los linfocitos Th2 que reconocen el péptido presentado por el MHC del linfocito B se activan y envían señales, vía contacto directo (CD154-CD40) o vía factores solubles (IL4, IL10, IL13), que activan a los linfocitos B. Los linfocitos Th2 generalmente han sido previamente activados por otros linfocitos B o por otras APCs (macrófagos o células dendríticas).

Los linfocitos B pueden diferenciarse a células plasmáticas productoras de anticuerpos o a células B de memoria. El que se conviertan en uno u otro tipo celular depende probablemente de las señales recibidas en el momento de abandonar el centro germinal. La diferenciación hacia célula plasmática probablemente se deba a señales recibidas por el linfocito B a través del correceptor CD19/CD21/CD81 desde la molécula CD23 expresada en la membrana de las células dendríticas foliculares o liberada de forma soluble al medio por estas mismas células. La diferenciación hacia células de memoria dependería de las señales recibidas por el linfocito B a través de CD40 desde su ligando en los linfocitos T (CD154), requiriendo, por tanto, nuevos contactos con los linfocitos Th.



## **6. ACTIVACIÓN LINFOCITARIA EN AR**

En la AR los linfocitos B, funcionalmente anormales, parecen tener un cierto papel en la patogenia. Los linfocitos B expresan antígenos de activación intermedios y tardíos y secretan espontáneamente FR, tanto en el LS (Eliaou JF et al, 1988) (Wernick RM et al, 1985) como en sangre periférica (Nakao H et al, 1989) (Al-Balaghi S et al, 1984) (Olsen NJ et al, 1985). También se ha descrito la hiperexpresión del antígeno de activación precoz CD23 en sangre periférica (Kumagai S et al, 1989) y en MS (Hellen EA et al, 1991), la presencia de CD23 soluble es mayor en sangre periférica (Chomarat P et al, 1993) y en el LS (Delespesse G et al, 1992) de pacientes con AR. Todo ello sugiere que estas anomalías funcionales se encuentran presentes desde las fases iniciales de la activación de los linfocitos B.

La presencia de FR, que refleja una hiperreactividad de los linfocitos B, se asocia con un peor pronóstico y la existencia de manifestaciones tales como vasculitis. Sobre el significado biológico del FR, independientemente del desarrollo de manifestaciones clínicas dependientes del depósito de ICC, su papel en la patogenia de la AR parece ser limitado. Es posible que la existencia de un FR elevado solamente indique que los linfocitos B están siendo activados policlonalmente en el curso de una disfunción de la inmunorregulación mucho más amplia.

En la actualidad es posible reproducir en el laboratorio la activación de los linfocitos T y B, analizando posteriormente los parámetros funcionales característicos de estas células. Para ello se utilizan distintos estímulos, tanto de membrana como transmembranales. Dentro de los estímulos de membrana cabe destacar el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas presentes en la superficie celular T (CD3, CD28, CD69, CD25) o en la superficie celular B (IgM, CD40, IL4R), permitiendo estudiar distintas vías de activación de forma independiente. Los estímulos transmembranales más utilizados son la combinación del éster de forbol mirístico (PMA), que es un activador directo de la PKC, y la ionomicina, un ionóforo que abre canales de calcio. Figura 4.

Figura 4. Activación linfocitaria en el laboratorio.

Tras la activación con estos estímulos se pueden analizar diversas funciones efectoras, como las respuestas inmediatas (movilización de calcio o fosforilación), las respuestas tempranas (inducción de proteínas de membrana o síntesis de citocinas) o las respuestas tardías (proliferación celular o secreción de citocinas).

Previamente se había demostrado que tanto la activación, medida como inducción de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B, como la diferenciación o la producción de Igs de isotipo específico por los linfocitos B dependiente de células T son particularmente eficientes en pacientes con AR (Morado-Qiñoa I et al, 1996). En ambos fenómenos se ha descrito la participación de la molécula CD154 (MacDonald KPA et al, 1997).

La molécula CD23 es miembro de la superfamilia de lectinas animales de tipo C. CD23 es receptor de baja afinidad de IgE (Yukawa K et al, 1987) (Bonney JY et al, 1987) y es ligando de CD21 (Aubry JP et al, 1992). Se expresa en varios tipos de células hematopoyéticas, incluyendo linfocitos B y algún linfocito T, células dendríticas foliculares, monocitos, plaquetas, células de Langerhans, eosinófilos y células NK (Crow

MK et al, 1986) (Delespesse G et al, 1992). CD23 participa en varias actividades biológicas, incluyendo adhesión celular, supervivencia de los linfocitos B en los centros germinales, producción de histamina por basófilos y regulación de la síntesis de IgE (Bonney JY et al, 1993). También se relaciona con el crecimiento de linfocitos B, maduración de pro-timocitos, proliferación de precursores mieloides, inhibición de la migración de macrófagos y presentación de antígeno (Gordon J, 1991), aunque no todas estas actividades pueden ser atribuidas a la interacción de CD23 con IgE o con CD21.

CD23 normalmente no se expresa o lo hace en bajo porcentaje en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), induciéndose su expresión en la superficie de linfocitos B tras cultivo en presencia de IL4 (De France T et al, 1987) o por contacto con linfocitos Th activados (Crow MK et al, 1989). CD23 aparece en la membrana de linfocitos B tras 4 horas de estímulo (fase pre-G1 del ciclo celular) con un pico máximo de expresión de 16-24 horas. Posteriormente es liberada al medio, tras proteólisis, apareciendo en forma soluble, también biológicamente activa, no detectándose su expresión en la superficie celular a las 72 horas. Varios trabajos han demostrado una regulación específica de esta molécula en enfermedades reumáticas autoinmunes como en el caso de LES y AR (Kumagai S et al, 1989) (Chomarat P et al, 1993) (Fernández-Gutiérrez B et al, 1998).

El hecho de que la expresión de CD23 esté aumentada en enfermedades en las cuales IgE no se encuentra implicada y las actividades de CD23 no puedan atribuirse a su unión con IgE o con CD21 ha llevado a la búsqueda de otros ligandos. Así se ha comprobado que CD23 también interacciona con  $\beta_2$  integrinas, CD11b y CD11c, en macrófagos (Lecoanet-Henchoz S et al, 1995). Las integrinas CD11b y CD11c son moléculas de adhesión que participan en interacciones célula-célula y célula-matriz (Springer TA, 1990), el significado funcional de la unión de CD23 se ha demostrado en experimentos *in vitro*, viendo su participación como mediador proinflamatorio.

# **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL:**

Analizar los mecanismos implicados en la activación de los linfocitos T y B procedentes de sangre periférica y de líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide (AR).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. ESTUDIO 1. Expresión de CD23 y CD154 en los linfocitos T de pacientes con AR.

1.1. Analizar la expresión de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B de sangre periférica de pacientes con AR.

1.2. Analizar la variación en la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de sangre periférica tras distintos estímulos y los mecanismos implicados en la cooperación celular T-B.

1.3. Analizar la expresión de la molécula de activación CD154 en la superficie de los linfocitos T procedentes de sangre periférica y de líquido sinovial de estos pacientes.

1.4. Analizar mediante inmunohistoquímica la membrana sinovial procedente de pacientes con AR con el fin de correlacionar las posibles alteraciones con las observadas en sangre periférica y en líquido sinovial.

2. ESTUDIO 2. Expresión de CD23 y CD154 en los linfocitos T de pacientes con AR sometidos a terapia con un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ .

2.5. Analizar la influencia del tratamiento sobre la activación linfocitaria T y B en sangre periférica de AR.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# 1. ESTUDIO 1: EXPRESIÓN DE CD23 Y CD154 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

## 1.1. SUJETOS DE ESTUDIO

El estudio se realizó en pacientes controlados en el Servicio de Reumatología del Hospital Clínico San Carlos y clasificados según los criterios revisados del *American College of Rheumatology* (Arnet FC et al, 1988) para el diagnóstico de artritis reumatoide (AR). La enfermedad activa fue definida por la presencia, en los individuos estudiados, de tres de los cuatro criterios siguientes:

- rigidez matutina: rigidez en y alrededor de las articulaciones que dura más de una hora antes de que se alcance la mejoría funcional máxima y presente durante al menos 6 semanas.
- velocidad de sedimentación globular mayor de 28 mm/h.
- presencia de más de 3 articulaciones inflamadas.
- presencia de más de 6 articulaciones dolorosas o con dificultad de movimiento.

Se incluyeron 25 pacientes con diagnóstico de AR y con criterios de actividad, ninguno de ellos tomaba más de 10 mg diarios de prednisona ni fármacos antagonistas del calcio. No fueron incluidos en el estudio pacientes con otra enfermedad sistémica.

Voluntarios sanos del Hospital Clínico San Carlos, del mismo rango de edad y sexo, formaron el grupo control del estudio.

## 1.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Las muestras de sangre periférica (SP), tanto de pacientes con AR como de individuos sanos, fueron extraídas, tras su consentimiento, mediante venopunción en tubos con heparina. Las muestras de líquido sinovial (LS) de pacientes con AR fueron obtenidas mediante artrocentesis de la rodilla, tras aspiración aséptica en tubos con heparina cuando estaba clínicamente indicado. Una vez extraídas las muestras y diluidas en solución Hank's (GIBCO BRL, Pislely, Scotland), en proporción 1/2 las muestras de SP y en proporción 1/3 las muestras de LS, se realizó el aislamiento de células mononucleares, tanto de SP (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) como de LS (SFMC, *sinovial fluid mononuclear cells*). Mediante centrifugación, en gradiente de densidad con Ficoll-Hipaque (Lymphoprep, Nyegaard, Noruega), durante 45 min a 1800 rpm en una centrífuga

Beckman GPR (Beckman Coulter) y a temperatura ambiente. Una vez aisladas, las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Flow Laboratories, Irvine, Scotland), suplementado con suero de ternera fetal (10%, FCS, GIBCO), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y glutamina (2 mM, Biowhitaker, Berkshire, UK).

### **1.3. PREPARACIÓN DE TEJIDO SINOVIAL**

Se obtuvieron membranas sinoviales de pacientes con AR sometidos a intervención quirúrgica cuando fue clínicamente indicado. El tejido, mantenido en suero fisiológico, se congeló en isopentano y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los cortes histológicos. Los cortes, de 5-6  $\mu$ , se realizaron en un criostato a  $-30^{\circ}\text{C}$ , se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se fijaron en acetona durante 10 min. Finalmente, fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los marcajes de inmunofluorescencia.

### **1.4. ANÁLISIS FENOTÍPICOS**

#### **1.4.1. Marcajes extracelulares**

Las células procedentes de SP y/o LS, tras varios lavados a 1200 rpm durante 8 min en PBS (*phosphate-buffered saline*) + 1% BSA (*bovine serum albumin*), se dispensaron en una placa de 96 pocillos de fondo en U (Soria-Greiner, Madrid, España). A continuación se centrifugaron 2 min a 1200 rpm, se decantaron los sobrenadantes, se resuspendieron las células y se añadieron los anticuerpos monoclonales o antisueros correspondientes, incubándose durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. Cuando los anticuerpos monoclonales estaban directamente conjugados, tras la incubación se realizaron 2 lavados en PBS + 1% BSA, se resuspendieron en 250  $\mu\text{l}$  de PBS al 1% de formaldehído y se analizaron por citometría de flujo. En el caso de la utilización de anticuerpos monoclonales no conjugados directamente, tras la primera incubación se realizaron dos lavados con PBS + 1% BSA y se realizó una segunda incubación con un anticuerpo secundario (*goat anti-mouse*), directamente conjugado, durante 45 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS + 1% BSA, se resuspendieron en 250  $\mu\text{l}$  de PBS al 1% de formaldehído y se analizaron por citometría de flujo.



### **1.4.2. Citometría de flujo**

Para el análisis de la expresión en superficie de las distintas moléculas linfocitarias se utilizaron los anticuerpos monoclonales, conjugados o no con los distintos fluoróforos, reseñados en la tabla 2. La cuantificación del marcaje se realizó con un citómetro de flujo EPICS Profile II (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA). Las células fueron seleccionadas por criterios de tamaño/complejidad con el fin de eliminar las no viables y fueron analizadas, al menos, 5.000 células por muestra. Los resultados se representaron en histogramas uni o bidimensionales. En los primeros, las abscisas representan la intensidad de fluorescencia, analizado en una escala logarítmica, y las ordenadas representan el número de células. En los histogramas bidimensionales, se representa en abscisas la intensidad de fluorescencia del fluoróforo fluoresceína (FITC) y en ordenadas la intensidad de fluorescencia del fluoróforo ficoeritrina (PE), analizándose en ambos casos en escala logarítmica.

Las células que presentaban intensidades de fluorescencia por encima del límite superior de la distribución del control negativo se consideraron positivas. La densidad del antígeno se calculó indirectamente a través de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células analizadas. La intensidad de fluorescencia de las células positivas para los distintos anticuerpos fue determinada en una escala logarítmica.

### **1.4.3. Inmunohistoquímica de membrana sinovial (MS)**

Los cortes histológicos obtenidos previamente, se fijaron en cloroformo durante 20 min, se lavaron con PBS y se realizaron las tinciones siguiendo el KIT HISTOSTAIN DS™ (Zymed Laboratories Inc, CA, USA). Se estudiaron los marcadores de activación CD23 en los linfocitos B y CD154 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentes en los cortes histológicos de la MS de pacientes con AR. Para ello, las muestras se incubaron 10 min a temperatura ambiente con una solución de suero bloqueante antes de añadir el anticuerpo primario 1, que en nuestro caso fue CD20 (dilución 1/20 del sobrenadante del hibridoma L26), CD4 (dilución 1/10 del sobrenadante del hibridoma OKT4) o CD3 (dilución 1/10 del sobrenadante del hibridoma 454) (ver tabla 2). Tras una incubación de 30-60 min a temperatura ambiente, los cortes se lavaron 3 veces en 0,05% PBS-Tween-20 y se añadió el anticuerpo secundario biotinilado, incubando 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron los cortes, se añadió fosfatasa alcalina-estreptavidina, incubando durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo los cortes y se añadió el sustrato cromógeno, que en este caso fue Fast blue durante 5-10 min. Finalmente,

tras lavar los cortes en agua destilada se comprobaron los marcajes en un microscopio Nikon Eclipse E400.

Tras verificar los marcajes del anticuerpo 1 las preparaciones fueron incubadas durante 30 min con un potenciador de la doble tinción, tras lo cual fueron lavadas y se añadió un suero no-inmune (cabra) incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, fue añadido el anticuerpo primario 2 (ver tabla 2), que en nuestro caso fue CD23 (sobrenadante del hibridoma EBVCS<sub>2</sub>) o CD154 (dilución 1/10 del mAb TRAP1), incubando durante 30-60 min a temperatura ambiente. Tras lavar los cortes en 0,05% PBS-Tween-20, fue añadido el anticuerpo secundario biotinilado, incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado se incubó 10 min con peroxidasa-estreptavidina, lavando e incubando 5-10 min con el sustrato colorimétrico Diamino benzidina. Por último, se lavaron en agua corriente los cortes, se montaron las preparaciones usando Clearmount y se estudiaron por microscopía.

**Tabla 2. Anticuerpos monoclonales e hibridomas utilizados en el presente trabajo, en el análisis fenotípico por citometría de flujo, ensayos funcionales e inmunohistoquímica.**

Especificidad	Nombre	Origen
CD3	454	Dr. S. Friedman, Hospital for Special Surgery, NY, USA
CD4	13B8.2	Coulter, Immunotech, Marseille, France
CD19	B4.RD1	Coulter, Immunotech, Marsella, France
CD23	B6-RD1	Coulter Corporation, Florida, USA
CD40	MAb89	Coulter, Immunotech, Marseille, France
CD45	D3/9	Dr. F. Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain
CD154	HCD40-H $\mu$	Dr. P. Lane, Basel Institute, Geneva, Swizerland
Negativo	MslgG1-RD1/FITC	Coulter, Immunotech, Marseille, France

Especificidad	Nombre	Origen
CD4	OKT4	Dr. F. Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain
CD20	L26	DAKO Co, Denmark
CD23	EBVCS <sub>2</sub>	Dr. S. Friedman, Hospital for Special Surgery, NY, USA
CD154	TRAP1	DAKO Co, Denmark

## 1.5. ANÁLISIS FUNCIONALES

### 1.5.1. Estudio de moléculas de activación

#### 1.5.1.1. Ensayo de inducción de CD23 en los linfocitos B de SP

En todos los ensayos descritos a continuación las células fueron incubadas en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C durante 18 horas. Posteriormente fueron lavadas con solución Hank's y se incubaron durante 1 hora a 4°C con eritrocitos de carnero previamente tratados con neuraminidasa (SRBC-N, *sheep red blood cells-N*) (Gottlieb AB et al, 1979). Para ello, los eritrocitos de carnero (Biomerieux SA, Marcy-L'Etoile, Francia) fueron lavados con suero salino fisiológico y posteriormente fueron incubados a 37°C con neuraminidasa (0,3 U en 10 ml, Sigma) durante 20 min. Tras la incubación de las células con SRBC-N y mediante centrifugación en gradiente de densidad se obtuvieron dos fracciones, una adherida a los SRBC-N (fracción E<sup>+</sup>) formada principalmente por linfocitos T y otra no adherida (fracción E<sup>-</sup>) formada principalmente por linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. En la población E<sup>-</sup> obtenida tras el roseteo fue analizada la expresión de la molécula CD23 en la superficie de los linfocitos B realizando doble marcaje CD19FITC (B4.RD1)/CD23PE (B6.RD1). Los experimentos fueron seleccionados para analizarse por citometría de flujo cuando el porcentaje de células CD19<sup>+</sup> de la población E<sup>-</sup> fue superior al 20%.

Con el fin de realizar el estudio de la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de 15 pacientes con AR y de sus respectivos controles pareados en edad y sexo, los PBMC fueron resuspendidos en medio de cultivo completo, a 5x10<sup>6</sup> células/ml, en tubos de 10 ml de fondo redondo (Soria-Greiner) en un volumen final de 0,5 ml. Posteriormente, se incubaron las células en presencia o ausencia de anti-CD3 soluble (*anti-human* CD3 IgG2a murino, dilución 1/10 del sobrenadante del hibridoma 454, concentración saturante).

Paralelamente, se estudió la inhibición de la inducción de CD23 en la superficie de las células incubadas con anti-CD3 soluble en presencia o ausencia de distintos anticuerpos bloqueantes, relacionados con mecanismos de cooperación celular T-B:

- anti-CD154 (dilución 1/10 del sobrenadante del hibridoma hCD40-H $\mu$ ) (Lane P et al, 1992).
- anti-CD40 (clon mAb89, 1  $\mu$ g/ml).

Los experimentos de inhibición fueron realizados usando dichos anticuerpos a concentraciones saturantes y en presencia de suero humano AB para eliminar la contribución de los receptores Fc.

El porcentaje de inhibición fue calculado según la siguiente fórmula:

$$X = 100 - \frac{\text{expresión de CD23 en presencia de anti-CD3 y anticuerpo bloqueante}}{\text{expresión de CD23 en presencia de anti-CD3}} \times 100$$

En algunos casos, se analizó la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de pacientes con AR cultivados en presencia de linfocitos T procedentes de LS de estos pacientes. Para ello, la población E<sup>-</sup> de SP fue cultivada en presencia de la población E<sup>+</sup> de LS de estos mismos pacientes. Previamente fueron lisados los SRBC-N con agua destilada. Paralelamente, se estudió el efecto en estos co-cultivos, de anticuerpos bloqueantes de la cooperación celular: anti-CD154 y anti-CD40.

#### *1.5.1.2. Ensayo de inducción de CD154 en los linfocitos Th*

Se analizó la expresión e inducción de la molécula de activación CD154 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> procedentes de SP y de LS de 25 pacientes con AR y en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> procedentes de SP de sus respectivos controles. Para ello, los PBMC o SFMC, resuspendidos en medio de cultivo completo, a 5x10<sup>6</sup> células/ml, fueron incubados con distintos estímulos:

- anti-CD3 (dilución 1/10 del sobrenadante del hibridoma 454, a una concentración saturante) pegado a plástico, en tubos de 10 ml de fondo redondo. Para ello, se incubó anti-IgG F(ab)<sub>2</sub> (*goat anti-mouse*, Sigma), a una concentración de 7,5 µg/ml, en tubos de 10 ml de fondo redondo durante 24 h a 4°C. Posteriormente, se incubó 1 h con medio de cultivo completo a temperatura ambiente y tras lavar los tubos se añadió anti-CD3 (hibridoma 454) durante 1 h a temperatura ambiente.
- PMA (10 ng/ml) + ionomicina (1 µg/ml) (Sigma).

Las células se resuspendieron en un volumen final de 0,5 ml y tras 6 horas de incubación en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Para ello, tanto los PBMC como los SFMC fueron marcados usando CD4PE (13B8.2) con su respectivo control de isotipo y utilizando la proteína de fusión hCD40-Hµ (CD154) unida a fragmentos F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM humana conjugados con FITC.

## 2. ESTUDIO 2: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL mAb ANTI-TNF $\alpha$ EN LA EXPRESIÓN DE CD23 Y CD154 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

### 2.1. SUJETOS DE ESTUDIO

En el Servicio de Reumatología del Hospital Clínico San Carlos se llevó a cabo un estudio en fase III, multicéntrico, doble ciego, randomizado a 5 ramas y controlado con placebo con el fin de comprobar la eficacia del uso de diferentes dosis del anticuerpo monoclonal D2E7 (Laboratorios Knoll). D2E7 es un anticuerpo monoclonal recombinante formado por una Ig completa con gran afinidad por el TNF $\alpha$  humano. Este monoclonal es el primero de los antagonistas de TNF $\alpha$  que está formado exclusivamente por secuencias humanas. Para ello, los genes de la cadena pesada y ligera del monoclonal fueron insertados en un plásmido que fue transfectado en células CHO, los clones positivos fueron seleccionados y amplificados (Roguska MA et al).

Los pacientes incluidos en el estudio debían cumplir los siguientes criterios de selección:

- Criterios de inclusión:

- Diagnóstico de AR definido.
- Al menos un fracaso terapéutico con *DMARDs*.
- Al menos 10 articulaciones inflamadas de 66 evaluadas.
- Al menos 12 articulaciones con dolor a la palpación de 68 evaluadas.
- VSG > 28 mm/h o PCR > 2 mg/dl.
- Edad: 18 años o más.
- Prueba de embarazo negativa (urinaria) en mujeres en edad fértil.
- Uso de un método anticonceptivo fiable en mujeres en edad fértil.
- Capaz y dispuesto a dar el consentimiento informado por escrito y a cumplir los requisitos del protocolo de estudio.
- Peso corporal < 100 Kg.

- Criterios de exclusión:

- Artritis juvenil crónica.
- Creatinina sérica superior a 1,5 mg/dl (133 $\mu$ mol/l).

- GOT o GPT superiores al doble del límite del valor normal de laboratorio, o bilirrubina > 3 mg/dl (> 51  $\mu\text{mol/l}$ ).
- Hemoglobina inferior a 8,5 g/dl (5,28 mmol/l) en varones y a 8 g/dl (4,97 mmol/l) en mujeres.
- Recuento total de leucocitos inferior a  $3 \times 10^9/\text{l}$ .
- Recuento de plaquetas inferior a  $150 \times 10^9/\text{l}$ .
- Embarazo o lactancia.
- Infección por VIH conocida.
- Historia de alcoholismo o drogodependencia en los seis meses previos a la selección para el estudio.
- Historia de tuberculosis activa o listeriosis.
- Necesidad permanente de silla de ruedas o encamamiento.
- Cualquier tipo de infección en el momento de la selección o cualquier episodio de infección grave que haya requerido hospitalización o tratamiento con antibióticos intravenosos en los 30 días previos a la selección para el estudio.
- Administración intraarticular o parenteral de corticosteroides en las 4 semanas previas a la selección para el estudio.
- Cirugía articular en los 2 meses previos a la selección para el estudio (en las articulaciones evaluadas para este estudio).
- Tratamiento con cualquier fármaco de investigación de naturaleza “química” en los dos meses previos a la selección para el estudio.
- Tratamiento con cualquier fármaco biológico de investigación en los seis meses previos a la selección para el estudio.
- Tratamiento previo con cualquier antagonista biológico del TNF (D2E7, Enbrel<sup>®</sup>, Remicade<sup>®</sup>) o inclusión anterior a este estudio.
- Procesos de índole cardíaca, pulmonar, metabólica, renal o gastrointestinal subyacentes, enfermedades infecciosas crónicas o latentes, o inmunodeficiencia que en opinión del investigador sometan al paciente a un riesgo no aceptable por la participación en el estudio.
- Historia de linfoma o leucemia.
- Historia de cualquier tumor sólido maligno en los últimos 10 años, excepto carcinoma basocelular cutáneo curado.

Se realizó el estudio sobre las alteraciones linfocitarias en SP de 6 pacientes con AR, previamente seleccionados, y sometidos a terapia con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7). Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio tomaba otro medicamento remititivo a excepción del anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ . La dosis permitida de prednisona era <10 mg/d.

## **2.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

Las muestras de SP de 6 pacientes con AR sometidos a terapia con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  fueron obtenidas en el día 0 o tras 16 semanas de tratamiento. En el momento de realización del experimento, a las 16 semanas, todos los pacientes estaban en tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ . La obtención de PBMC se realizó siguiendo el proceso descrito en el apartado 1.2.

Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación inicial de las muestras de SP se conservaron y almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en el estudio de citocinas (TNF $\alpha$ ) e inmunocomplejos circulantes (ICC).

## **2.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE AMÍGDALA**

Se aisló la población linfoide a partir de amígdalas obtenidas de individuos con procesos repetitivos de infecciones y sometidos a una amigdalectomía. Para ello, el tejido fue mantenido en suero fisiológico hasta su procesamiento mediante disgregación y posteriormente fue filtrado a través de una gasa estéril. La población linfoide fue aislada mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hipaque y las células obtenidas se lavaron con solución Hank's (Gibco). La fracción E<sup>-</sup> obtenida tras el roseteo con SRBC-N formada mayoritariamente por linfocitos B (>95% CD19<sup>+</sup>), fue utilizada en posteriores ensayos.

## **2.4. ESTUDIO DE MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN**

### **2.4.1. Ensayo de inducción de CD23 en los linfocitos B de SP**

Se realizó el estudio de la expresión e inducción de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP a tiempo 0 o tras 16 semanas del inicio del tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  en 6 pacientes con AR. Para

ello, los PBMC fueron resuspendidos en medio de cultivo completo, a  $5 \times 10^6$  células/ml, en tubos de 10 ml de fondo redondo en un volumen final de 0,5 ml. Posteriormente, se incubaron las células en presencia o ausencia del mAb 454 (anti-human CD3 IgG2a murino, dilución 1/10 del hibridoma).

Paralelamente, se estudió la inhibición de la inducción de CD23 en la superficie de las células incubadas con anti-CD3 soluble en presencia o ausencia de distintos anticuerpos bloqueantes de la cooperación celular, anti-CD154 (dilución 1/10 del sobrenadante del hibridoma hCD40-H $\mu$ ) y anti-CD40 (clon mAb89).

Los experimentos de inhibición fueron realizados usando dichos anticuerpos a concentraciones saturantes y en presencia de suero humano AB para eliminar la contribución de los receptores Fc. El porcentaje de inhibición fue calculado según la fórmula descrita en el apartado 1.5.1.1.

En los ensayos descritos en este apartado las células fueron incubadas durante 18 h en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Posteriormente, se lavaron con solución Hank's y se incubaron durante 1 h a 4°C con SRBC-N, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.5.1.1. En la población E<sup>-</sup> obtenida tras el roseteo fue analizada la expresión de la molécula CD23 en la superficie de los linfocitos B realizando doble marcaje CD19FITC (B4.RD1)/CD23PE (B6.RD1). Los experimentos fueron seleccionados para analizarse por citometría de flujo cuando el porcentaje de células CD19<sup>+</sup> de la población E<sup>-</sup> fue superior al 20%.

#### **2.4.2. Ensayo de inducción de CD154 en los linfocitos T de SP**

A partir de PBMC de los 6 pacientes con AR, a tiempo 0 o tras 16 semanas del inicio del tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$ , se analizó la expresión e inducción de la molécula de activación CD154 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Para ello, los PBMC resuspendidos en medio de cultivo completo, a  $5 \times 10^6$  células/ml, fueron incubados con distintos estímulos:

- anti-CD3 (dilución 1/10 del sobrenadante del hibridoma 454, a una concentración saturante) pegado a plástico, en tubos de 10 ml de fondo redondo.
- PMA (10ng/ml) + ionomicina (1  $\mu$ g/ml)

Las células se resuspendieron en un volumen final de 0,5 ml y tras 6 h de incubación en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Para ello, los PBMC fueron marcados usando CD4PE (13B8.2) con su



respectivo control de isotipo y utilizando la proteína de fusión hCD40-H $\mu$  (CD154) unida a fragmentos F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM humana conjugados con FITC.

## **2.5. CUANTIFICACIÓN DE TNF $\alpha$ EN SUERO**

A partir de los sueros obtenidos tras la centrifugación de las muestras de SP de los pacientes con AR, a tiempo 0 o tras 16 semanas del inicio del tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$ , se analizó y cuantificó la presencia de TNF $\alpha$  en los mismos. Para ello, fue utilizado un inmunoensayo ELISA (R&D Systems Inc, MN, USA), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Brevemente, los sueros fueron incubados durante 2h a temperatura ambiente en una placa de 96 pocillos donde se encuentra pegado un anticuerpo monoclonal murino que une TNF $\alpha$ . Transcurrido el tiempo de incubación fueron lavados los pocillos y se añadió 200 $\mu$ l del antisuero policlonal anti-TNF $\alpha$  conjugado con peroxidasa y se incubó 2h a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado se incubó 20 min con el sustrato (tetrametilbenzidina) y se añadió la solución stop (ácido sulfúrico). Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados, expresados en pg/ml, se obtuvieron por interpolación en la curva patrón realizada en cada experimento. El límite de detección de este ensayo fue de 4,4 pg/ml.

## **2.6. CUANTIFICACIÓN DE ICC-TNF $\alpha$ EN SUERO**

Con el fin de estudiar la presencia, en los mismos sueros analizados anteriormente, de ICC formados por la presencia del anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  usado en el tratamiento de los pacientes con AR se realizó un inmunoensayo ELISA (Quidel, San Diego, CA, USA). Para ello, tras incubar los sueros en una placa de 96 pocillos que contiene la proteína humana C1q pegada a plástico durante 1h a temperatura ambiente, fueron lavados los pocillos e incubados durante 2h a temperatura ambiente en presencia del antisuero policlonal anti-TNF $\alpha$  conjugado con peroxidasa. Tras un nuevo lavado se incubó con el sustrato (tetrametilbenzidina) durante 20 min y se añadió la solución stop para efectuar la lectura. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450nm. En este último caso, los resultados no pudieron interpolarse en la curva patrón por lo que fueron representados según las variaciones observadas en la absorbancia.

## **2.7. ENSAYO DE INDUCCIÓN DE CD23 EN LOS LINFOCITOS B DE AMÍGDALA**

A partir de la población E<sup>-</sup> obtenida tras el procesamiento de la amígdala, fue analizada la expresión de la molécula CD23 en la superficie de los linfocitos B. Para ello, las células fueron mantenidas durante 18 h en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C, estudiando el efecto en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de distintos estímulos solubles. Los estímulos solubles fueron realizados bien con citocinas (IL4r, 1-100 U/ml, Genzyme), bien con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  usado en el tratamiento de estos pacientes o bien con los sueros obtenidos de estos pacientes con AR sometidos a dicho tratamiento, al inicio del mismo o tras 16 semanas.

La población E<sup>-</sup> fue resuspendida en medio de cultivo completo, a  $5 \times 10^6$  células/ml, en un volumen final de 0,5 ml. Tras la incubación fue analizada la variación en la expresión de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B realizando un doble marcaje CD19FITC (B4.RD1)/CD23PE (B6.RD1) y analizándolo por citometría de flujo.

## **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La normalidad de las variables analizadas se realizó con el test de Saphiro-Wilk. Los datos se representan como media  $\pm$  desviación estándar (SD) si cumplían la condición de normalidad y fueron comparadas usando el test paramétrico de la t de Student. Si los valores no se distribuían de manera normal (curva de Gauss), se utilizó el test no paramétrico de la mediana para el análisis estadístico, los valores se expresan como mediana y percentiles 25-75.

# **RESULTADOS**

## **1. ESTUDIO 1: EXPRESIÓN DE CD23 Y CD154 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

En el presente estudio se analizó la expresión de CD23 y de CD154 en la superficie de linfocitos procedentes de sangre periférica (SP) y de líquido sinovial (LS) de pacientes con AR, así como la implicación de la interacción CD40-CD154 en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de AR.

### **1.1. ESTUDIO DE MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN**

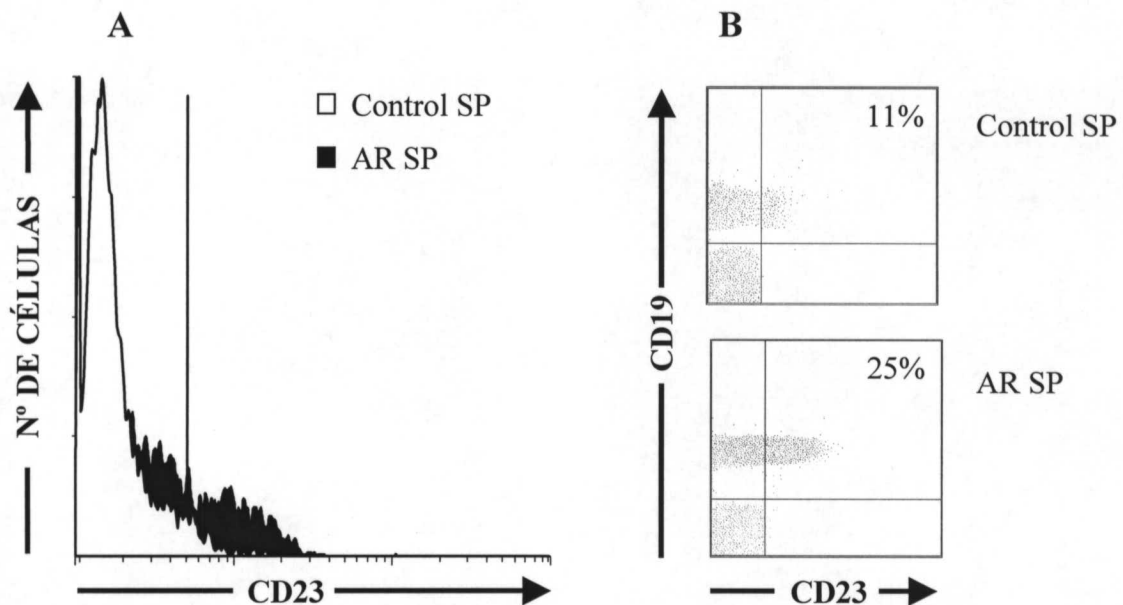
#### **1.1.1. Análisis de la expresión de CD23 en condiciones basales**

CD23 se expresa en varios tipos de células, incluyendo linfocitos B y algún linfocito T, células dendríticas foliculares, monocitos, plaquetas, células de Langerhans, eosinófilos y células NK. Participa en diversas actividades biológicas, incluyendo adhesión celular, supervivencia de los linfocitos B en los centros germinales, producción de histamina por basófilos y regulación de la síntesis de IgE. También se relaciona con el crecimiento de linfocitos B, maduración de pro-timocitos, proliferación de precursores mieloides, inhibición de la migración de macrófagos y presentación de antígeno.

Se analizó la expresión de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B de PBMC de 25 pacientes diagnosticados con AR y de individuos sanos pareados en edad y sexo. Para ello se realizó un estudio a tiempo 0 o tras 18 h de incubación en medio de cultivo completo. En la figura 5A se muestra el porcentaje de expresión de la molécula de activación CD23 en la superficie de PBMC de un paciente con AR y de un control tras 18 h de incubación en medio de cultivo. En la figura 5B se muestra el porcentaje de células dobles positivas para CD19 y para CD23 en un paciente con AR y en su control pareado tras incubar sus PBMC 18 h en medio de cultivo. Como puede observarse en ambas figuras los linfocitos B de SP de pacientes con AR tienen aumentada de forma basal la expresión de CD23 en su superficie respecto a la observada en los linfocitos B de SP de los controles. Tras analizar 25 pacientes con AR y sus respectivos controles un 20.5 % [18-26.2] de linfocitos B de SP expresaban CD23 en su superficie, en comparación con un 14% [11-22.7] en los controles,  $p=0.04$ . Figura 6.

La intensidad de fluorescencia media (MFI) fue equivalente en ambos grupos estudiados, 13% [10-21.5] vs 14% [12-18.5],  $p=1$ .

En el estudio realizado a tiempo 0 en PBMC de pacientes con AR y de controles los resultados obtenidos fueron similares (datos no mostrados).



**Figura 5. Expresión de CD23 en la superficie de linfocitos B de SP de pacientes con AR y de controles.** En la figura 5A se muestra un ejemplo representativo de la expresión de CD23 en la superficie de PBMC de un paciente con AR y de su correspondiente control de forma basal. En la figura 5B se muestra la expresión basal de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de un paciente con AR y de su control pareado, tras realizar doble marcaje CD19/CD23 y ser analizado por citometría de flujo. Los resultados se representan como porcentaje de células dobles positivas.

**Figura 6. Expresión basal de CD23 en la superficie de linfocitos B procedentes de SP de pacientes con AR y de controles.** La expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B, tras 18 h de incubación en medio de cultivo, se analizó en PBMC procedentes de pacientes con AR y de sus respectivos controles. Mediante roseteo se obtuvo la población E<sup>-</sup> y tras realizar doble marcaje CD19/CD23 se analizó por citometría de flujo. Los resultados se representan como mediana y percentiles.

### 1.1.2. Inducción de la expresión de CD23 a través de señales sobre los linfocitos T

Se analizó la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de 25 pacientes con AR y de sus respectivos controles en un ensayo de inducción de la expresión de CD23 a través de estímulos directos sobre la superficie de los linfocitos T de SP. Para ello, fueron incubados PBMC de pacientes y de controles en presencia de anti-CD3 soluble durante 18 h. Posteriormente, tras realizar un roseteo con SRBC-N se analizó la población E<sup>-</sup> mediante citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 7, donde se muestra el porcentaje de células dobles positivas para CD19 y para la molécula de activación CD23, se obtiene una mayor inducción de CD23 en los linfocitos B de SP de pacientes con AR tras estímulos directos sobre los linfocitos T de SP, respecto a la inducción observada en los linfocitos B de SP de los controles,  $52\% \pm 19$  vs  $33\% \pm 17$ ,  $p=0.01$ .

La MFI fue equivalente en ambos grupos estudiados,  $48\% \pm 24$  vs  $45\% \pm 22$ ,  $p=0.8$ .

**Figura 7. Inducción de la expresión de CD23 en la superficie de linfocitos B de SP de pacientes con AR y de controles tras estímulos directos sobre los linfocitos T.** La inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B fue analizada a partir de PBMC, tras 18 h de incubación con anti-CD3 soluble. Mediante roseteo se obtuvo la población E<sup>-</sup> que fue marcada para CD19/CD23 y se analizó por citometría de flujo. Los resultados se representan como media  $\pm$  SD.

### 1.1.3. Mecanismos implicados en la inducción de la expresión de CD23 a través de señales sobre los linfocitos T

Tras haber observado una mayor reactividad de los linfocitos B de SP de pacientes con AR tras estímulos directos sobre la superficie de los linfocitos T de SP, se estudiaron distintos mecanismos que podían contribuir a la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP. Para ello, PBMC de 25 pacientes y de sus respectivos controles fueron incubados durante 18 h con anti-CD3 soluble en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes, relacionados con mecanismos de contacto celular T-B. Los anticuerpos bloqueantes fueron usados a concentraciones saturantes y en presencia de suero humano AB para eliminar la contribución de los receptores Fc.

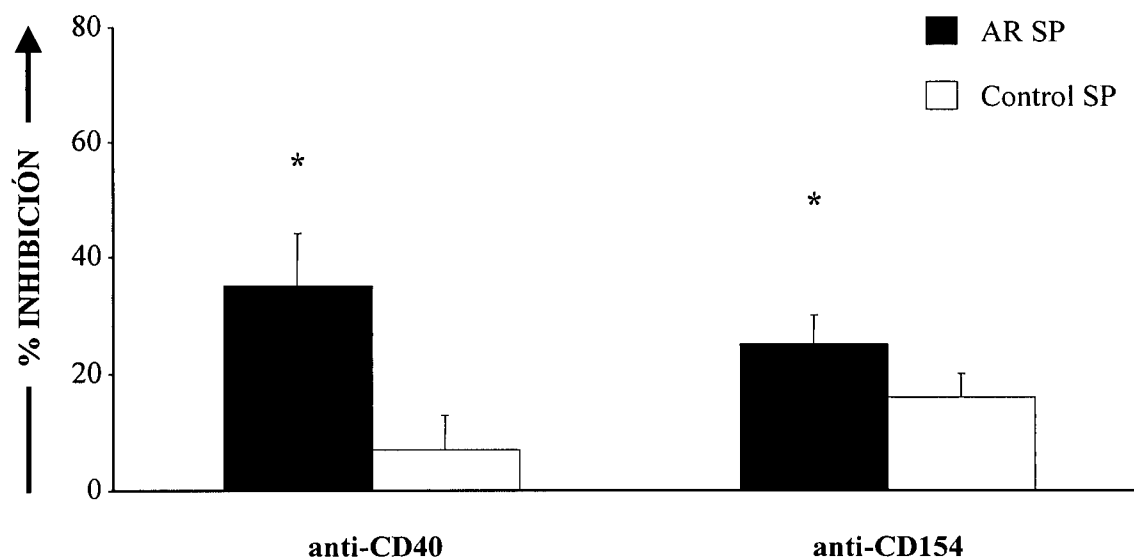
Los anticuerpos usados con el fin de bloquear los mecanismos de cooperación celular, principalmente la implicación de la vía CD40-CD154 en nuestros hallazgos, fueron anti-CD40 y anti-CD154. Posteriormente, tras realizar un roseteo con SRBC-N se analizó la expresión de CD23 en la población E<sup>r</sup> mediante citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 8, donde se muestra el porcentaje de células dobles positivas para CD19 y para la molécula de activación CD23, tanto en los pacientes con AR como en los controles, los anticuerpos bloqueantes provocan una disminución en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP,  $34.2\% \pm 17.5$  vs  $31.5\% \pm 14.7$ ,  $p=0.6$  en el caso de anti-CD40 y  $38.5\% \pm 17.2$  vs  $28\% \pm 15$ ,  $p=0.08$  en el caso de anti-CD154.

La MFI observada en los pacientes frente a los controles, en los casos estudiados, fue  $18.4\% \pm 10.5$  vs  $20.5\% \pm 11$ ,  $p=0.3$  para anti-CD40 y  $24\% [14-56]$  vs  $28\% [11-47]$ ,  $p=0.7$  para anti-CD154.

**Figura 8. Disminución de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de pacientes con AR y de controles tras bloquear mecanismos implicados en la vía de cooperación celular CD40-CD154.** La disminución de la inducción de la expresión de CD23 fue analizada a partir de PBMC, tras incubación 18 h con anti-CD3 soluble y con distintos agentes bloqueantes de la cooperación celular. Mediante roseteo se obtuvo la población E<sup>+</sup>. Se realizó doble marcaje CD19/CD23 y se analizó la expresión de CD23 mediante citometría de flujo. Los resultados se representan como media  $\pm$  SD.



En la figura 9 se muestra el porcentaje de inhibición observado en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de pacientes con AR y de controles tras utilizar los anticuerpos bloqueantes dirigidos frente a moléculas implicadas en la cooperación celular. La inhibición observada en el caso de los pacientes con AR vs controles fue  $35\% \pm 9$  vs  $7\% \pm 6$ ,  $p=0.0007$  para anti-CD40 y  $25\% \pm 5$  vs  $16\% \pm 4$ ,  $p=0.01$  para anti-CD154.



**Figura 9. Porcentaje de inhibición en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de pacientes con AR y de controles tras el uso de anticuerpos bloqueantes de la vía de cooperación celular CD40-CD154.** En las mismas condiciones que en la figura 8 se analizó la inhibición de la inducción de CD23 en la superficie de los linfocitos B tras incubar durante 18 h PBMC en presencia de anti-CD3 y de diferentes anticuerpos bloqueantes dirigidos frente a moléculas implicadas en mecanismos de cooperación celular. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición de la inducción de CD23 en la superficie de los linfocitos B en cada caso  $\pm$  SD.

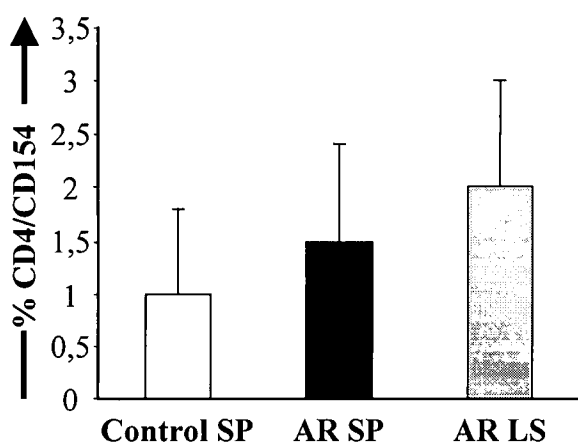
#### 1.1.4. Análisis de la expresión de CD154 en condiciones basales

CD154 es una molécula de activación crucial en el desarrollo inmunológico, se ha visto que está implicada en interacciones celulares Th-B, así como en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP. Por ello, se analizó la expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos Th en condiciones basales, a partir de PBMC de 25 pacientes con AR y de sus respectivos controles, pareados en edad y sexo, y a partir de SFMC de 15 pacientes con AR. Se realizó un estudio a tiempo 0 o tras una incubación de 6 h en medio de cultivo.

En la figura 10 se muestra el porcentaje de células dobles positivas para CD4 y para CD154, en pacientes y en controles tras 6 h de incubación en medio de cultivo. Como puede observarse, en condiciones basales el porcentaje de linfocitos Th que expresan CD154 en LS, aunque bajo, es superior al porcentaje de linfocitos Th que expresan CD154 en SP de pacientes con AR y de controles.  $2\% \pm 1$  en el caso de los linfocitos Th de LS de pacientes,  $1,5\% \pm 0,9$  en los linfocitos Th de SP de pacientes con AR y  $1\% \pm 0,8$  en los linfocitos Th de SP de los controles.

La MFI fue equivalente en todos los grupos estudiados,  $9,8\% \pm 3,3$  en el caso de los linfocitos Th de LS de pacientes,  $11,1\% \pm 5,4$  en los linfocitos Th de SP de pacientes con AR y  $12\% \pm 5,8$  en los linfocitos Th de SP de los controles pareados.

En el estudio realizado a tiempo 0 en PBMC de pacientes con AR y de controles, así como en SFMC de pacientes, los resultados obtenidos fueron similares (datos no mostrados).



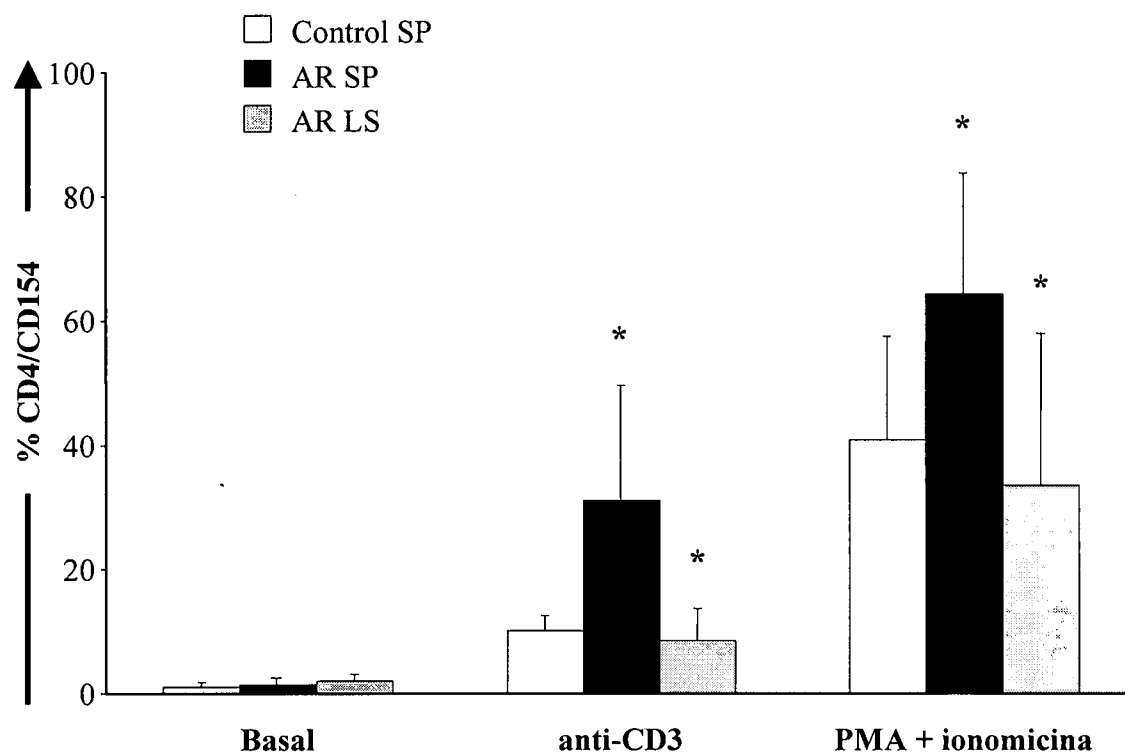
**Figura 10.** Expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos Th de LS y de SP de pacientes con AR, así como de linfocitos Th de SP de controles. La expresión basal de la molécula de activación CD154 en la superficie de los linfocitos Th fue analizada a partir de PBMC o de SFMC, tras 6 h de incubación en medio de cultivo, mediante citometría de flujo y tras realizar doble marcaje CD4/CD154. Los resultados representan el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> que expresan en superficie el marcador de activación CD154, representados como media  $\pm$  SD.

### 1.1.5. Inducción de la expresión de CD154

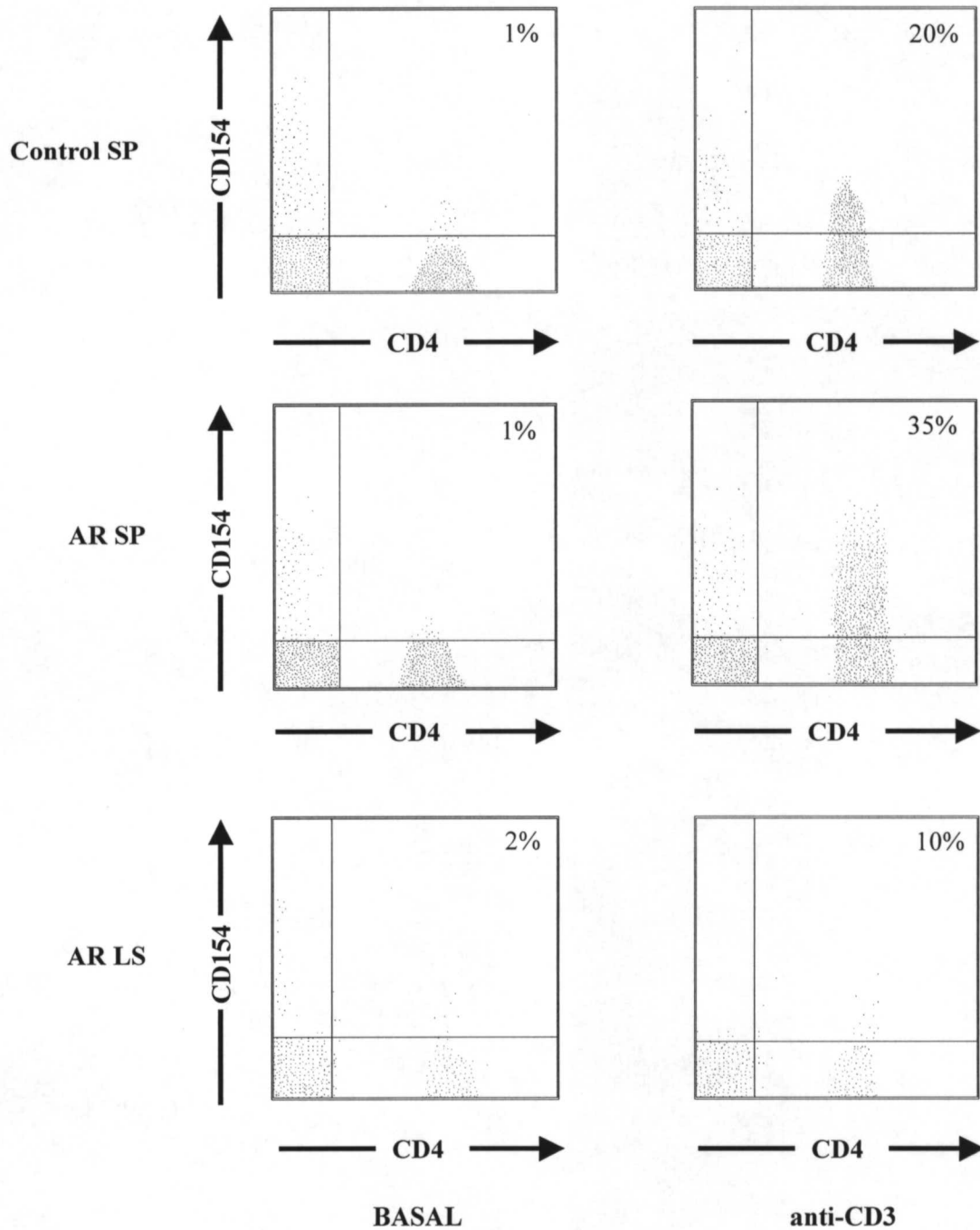
Se estudió la inducción de la expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos Th de SP de 25 pacientes con AR y de sus respectivos controles, así como en los linfocitos Th presentes en el LS de 15 de estos pacientes. Para ello, PBMC o SFMC fueron incubados durante 6 h en presencia de anti-CD3 pegado a plástico o de PMA + ionomicina. Como puede observarse en las figura 11 y 12, donde se muestra el porcentaje de células dobles positivas para CD4 y para la molécula de activación CD154, la inducción de la expresión de CD154 en los linfocitos Th de SP de los pacientes fue siempre superior a la obtenida en los linfocitos Th de SP de los controles, y en ambos casos fue superior a la observada en los linfocitos Th de LS de los pacientes con AR, cuando el estímulo utilizado fue anti-CD3 pegado a plástico o PMA + ionomicina.

La expresión de CD154 en los linfocitos Th de SP de pacientes con AR frente a la de los linfocitos Th de SP de los controles fue  $31\% \pm 18.6$  vs  $10\% \pm 2.5$ ,  $p=0.04$  en el caso de anti-CD3 y  $64.4\% \pm 19.3$  vs  $40.8\% \pm 16.6$ ,  $p=0.02$  en el caso de PMA + ionomicina. Mientras que los pacientes con AR poseen en condiciones basales un mayor porcentaje de linfocitos Th CD154<sup>+</sup> en LS (figura 10) que en SP de estos mismos pacientes y del grupo control, las células de LS tienen disminuida la capacidad de inducir la expresión de esta molécula,  $8.5\% \pm 5$  en el caso de anti-CD3 y  $33.5\% \pm 24.6$  para PMA + ionomicina. Cuando su respuesta se compara con la observada en los linfocitos Th de SP de los controles se obtiene una  $p=0.5$  para anti-CD3 y una  $p=0.15$  para PMA + ionomicina. Cuando se compara con la respuesta obtenida en los linfocitos Th de SP de los pacientes se obtiene  $p=0.03$  para anti-CD3 y  $p=0.001$  para PMA + ionomicina.

La MFI fue equivalente en todos los grupos estudiados, en el caso de anti-CD3 en los linfocitos Th de SP de los controles fue  $9.6\% \pm 2.3$ ,  $10.1\% \pm 3.1$  en los linfocitos Th de SP de los pacientes y  $8.5\% \pm 2$  en los linfocitos Th de LS de los pacientes. Para PMA + ionomicina fue  $10.8\% \pm 7.9$  vs  $16.7\% \pm 15$  vs  $10.7\% \pm 4.9$ .



**Figura 11. Inducción de la expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos Th de SP de pacientes con AR y de controles, así como en linfocitos Th de LS de pacientes con AR.** La inducción de la expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fue analizada a partir de PBMC o de SFMC, tras 6 h de incubación con anti-CD3 pegado a plástico o con PMA + ionomicina. Se analizó por citometría de flujo tras realizar doble marcaje CD4/CD154. Los resultados se representan como media  $\pm$  SD.



**Figura 12.** Inducción de la expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos Th de SP de un paciente con AR y de su control pareado, así como en los linfocitos Th de LS del mismo paciente. Ejemplo representativo de la inducción de la expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos Th, procedentes de PBMC o de SFMC, tras 6 h de incubación con anti-CD3 pegado a plástico. Se analizó por citometría de flujo tras realizar doble marcaje CD4/CD154. Los resultados se representan como porcentaje de células dobles positivas.

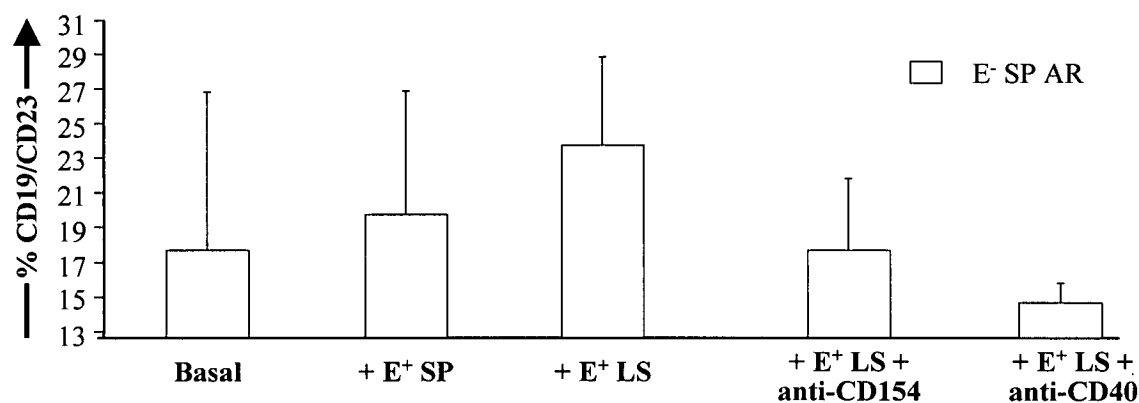
### 1.1.6. Co-cultivos con linfocitos T de LS

Con el fin de analizar los mecanismos relacionados con la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de pacientes con AR, se estudiaron mecanismos dependientes de contacto celular T-B, principalmente la vía de contacto CD40-CD154.

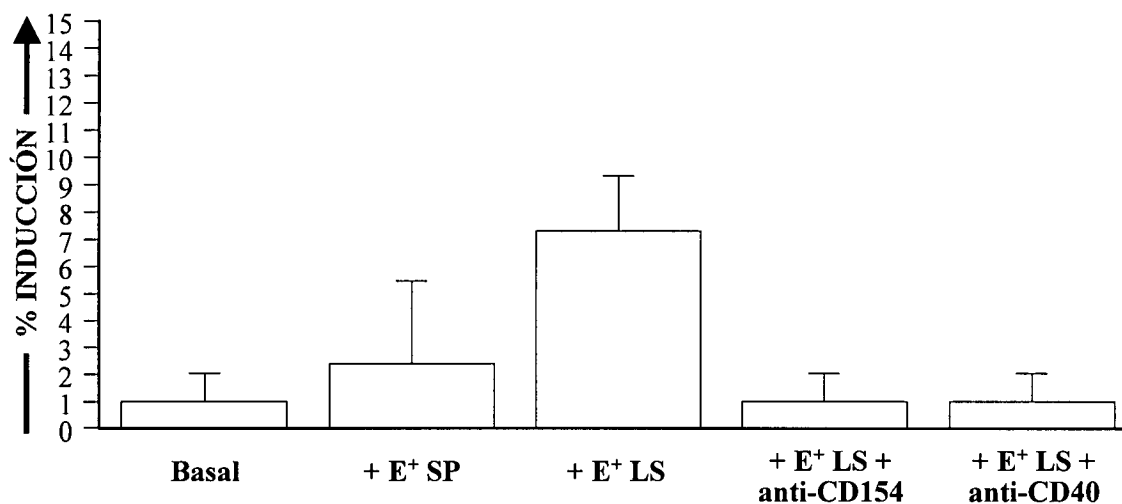
Con este propósito, a partir de SFMC de 5 pacientes con AR y tras roseteo con SRBC-N se estudió si la población E<sup>+</sup> (linfocitos T) procedente de LS de pacientes con AR influye en la expresión de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B (población E<sup>-</sup> obtenida tras roseteo) de SP de estos mismos pacientes. En paralelo se estudiaron posibles variaciones en la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de los pacientes tras incubación en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes de la vía de contacto CD40-CD154.

Como puede observarse en la figura 13, donde se muestra el porcentaje de células dobles positivas para CD19 y para la molécula de activación CD23, la expresión basal de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP (población E<sup>-</sup>) fue  $18\% \pm 9$ . Tras co-cultivo con la población E<sup>+</sup> de SP el porcentaje de linfocitos B que expresaban CD23 fue de un  $20\% \pm 7$ , mientras que tras co-cultivo con la población E<sup>+</sup> de LS fue  $24\% \pm 5$ . Tras co-cultivo con la población E<sup>+</sup> de LS y en presencia de anticuerpos bloqueantes de la vía CD40-CD154, se observó una disminución del porcentaje de linfocitos B (población E<sup>-</sup>) que expresaba CD23,  $18\% \pm 4$  en el caso de anti-CD154 y  $15\% \pm 1$  en el caso de anti-CD40. Estos resultados indican que los mecanismos dependientes de contacto celular, principalmente la vía CD40-CD154, son importantes en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de pacientes con AR.

En la figura 14 se representan los resultados, anteriormente descritos, como porcentaje de inducción de CD23 en la superficie de los linfocitos B (población E<sup>-</sup>) de SP tras los diferentes co-cultivos.



**Figura 13. Inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP (población E<sup>-</sup>) de pacientes con AR.** La población E<sup>-</sup> y la población E<sup>+</sup> fueron obtenidas a partir de PBMC y de SFMC de 5 pacientes con AR mediante roseteo. La población E<sup>-</sup> de SP de pacientes con AR fue incubada durante 18 h con la población E<sup>+</sup> de SP o de LS del mismo paciente, en este último caso se incubó también en presencia de anticuerpos bloqueantes dirigidos frente a moléculas implicadas en mecanismos de cooperación celular (anti-CD40 o anti-CD154). La expresión de CD23 se analizó por citometría de flujo tras realizar doble marcaje CD19/CD23. Los resultados se representan como media ± SD.



**Figura 14. Porcentaje de inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP (población E<sup>-</sup>) de pacientes con AR.** A partir de los resultados descritos en la figura 13 se midió el porcentaje de inducción de CD23 en la superficie de los linfocitos B procedentes de SP tras los diferentes cultivos descritos. Los resultados se representan como media ± SD.

## 1.2. INMUNOHISTOQUIMICA DE MS

En la figura 15A se puede observar la presencia en los cortes histológicos de MS de pacientes con AR de linfocitos CD19<sup>+</sup> que expresan el marcador de activación CD23 en su superficie. Por otro lado, en la figura 15B, se puede observar la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresan el marcador de activación CD154 en su superficie.

**Figura 15. Análisis inmunohistoquímico en MS de pacientes con AR.** En la figura A puede observarse que el número de linfocitos B presentes en los cortes histológicos es muy pequeño y no expresan CD23 en su superficie. En la figura B se observa un aumento en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y aproximadamente un 50% de éstos expresan CD154 en su superficie. Estas células se encuentran localizadas alrededor de los vasos sanguíneos. El aumento utilizado en el microscopio fue 40x.



## **2. ESTUDIO 2: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL mAb ANTI-TNF $\alpha$ EN LA EXPRESIÓN DE CD23 Y CD154 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE**

Influencia del tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  (D2E7) sobre la activación linfocitaria en pacientes con AR.

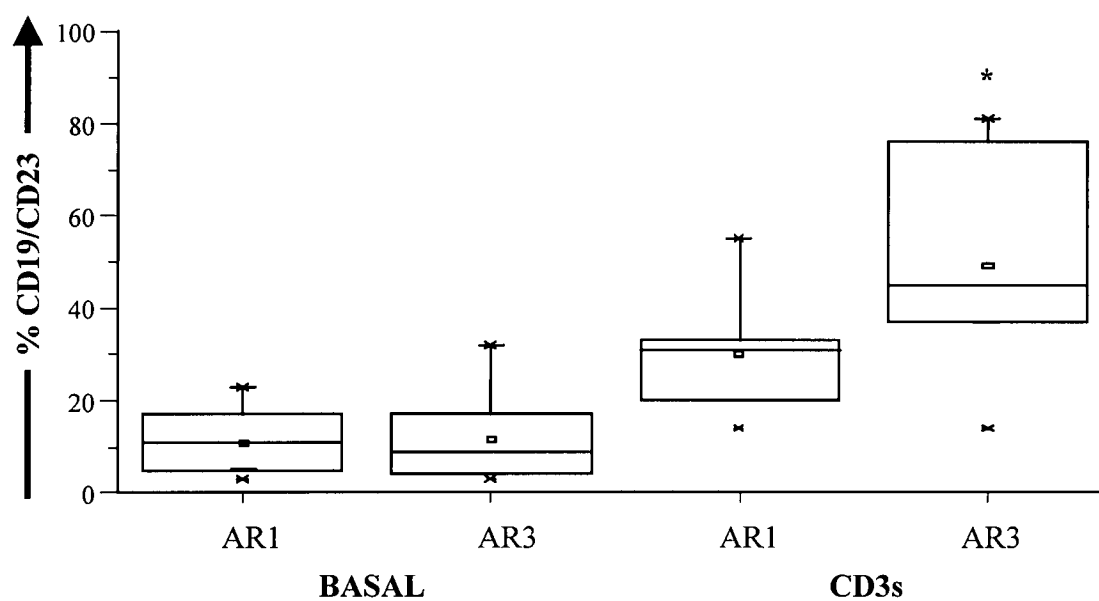
### **2.1. ESTUDIO DE MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN**

#### **2.1.1. Análisis de la expresión de CD23 en los linfocitos B de SP**

Como ya se ha descrito anteriormente, la expresión basal de CD23 así como su inducción tras distintos estímulos es superior en pacientes con AR, respecto a controles sanos. Así pues, estudiamos la influencia del tratamiento con el mAb anti-TNF $\alpha$  (D2E7) sobre la expresión basal y la inducción de la molécula de activación de linfocitos B, CD23.

Se realizó un estudio a tiempo 0 (AR1) o tras 16 semanas (AR3) del inicio del tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7) en 6 pacientes con de AR. Para ello, a partir de PBMC de estos pacientes se analizó la expresión de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B tras incubación durante 18 h en medio de cultivo en presencia o ausencia de anti-CD3 soluble. Como puede observarse en la figura 16, donde se muestra el porcentaje de células dobles positivas para CD19 y para la molécula de activación CD23, de forma basal la expresión de CD23 en los linfocitos B de SP de los pacientes a tiempo 0 del inicio del tratamiento (AR1) frente a los pacientes tras 16 semanas de tratamiento (AR3) fue similar, 11% [4.5-20] vs 9% [3.5-24.5],  $p=0.5$ . Cuando se incubó con anti-CD3 la inducción de la expresión de CD23 en los linfocitos B de SP fue superior en AR3, 31% [17-44] vs 45% [39-78],  $p=0.03$ .

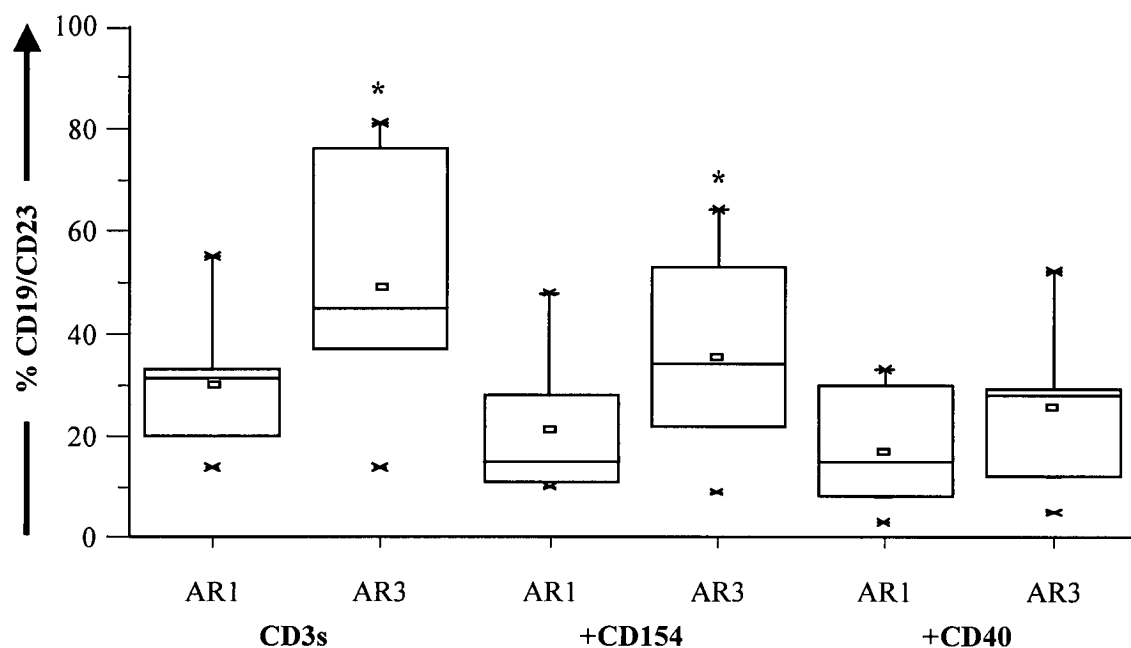
La MFI, en el estudio realizado en los pacientes AR1 frente a los pacientes AR3 fue 11.5% [10.75-14.5] vs 12% [10.75-14.25],  $p=1$  de forma basal y 30.5% [25-35] vs 59% [32.5-90],  $p=0.02$  cuando se incubó con anti-CD3 soluble.



**Figura 16.** Expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de pacientes con AR tratados con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7). La inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B, tras 18 h de incubación con anti-CD3 soluble, fue analizada en PBMC de pacientes con AR, a tiempo 0 o tras 16 semanas del inicio del tratamiento (AR1 y AR3, respectivamente). Mediante roseteo se obtuvo la población E<sup>r</sup> que fue marcada para CD19/CD23 y se analizó por citometría de flujo. Los resultados se representan como mediana y percentiles.

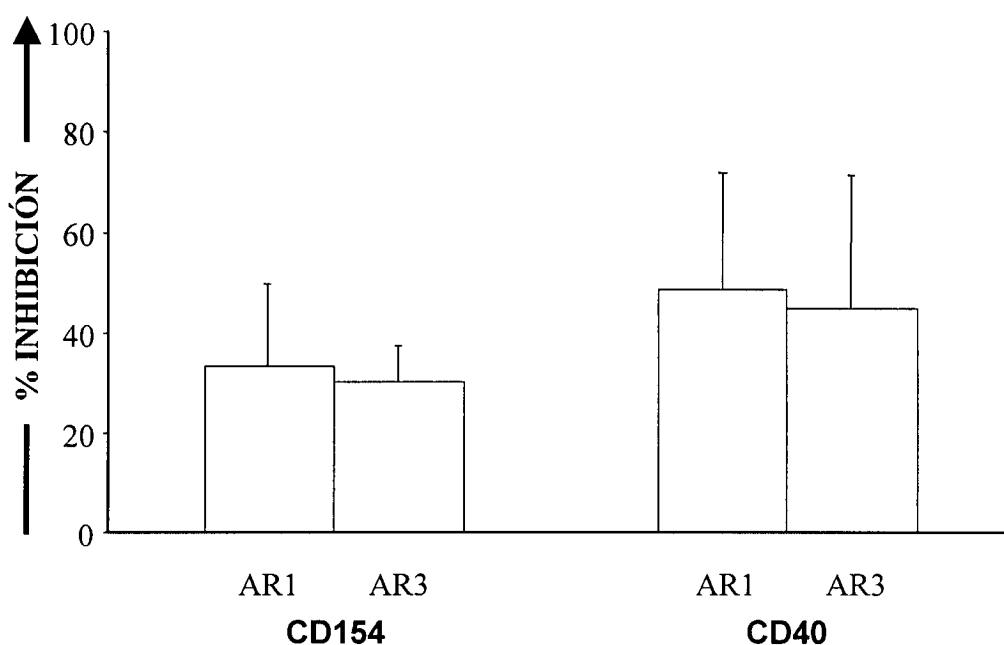
Paralelamente, se estudió la variación en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP obtenida tras incubar con anti-CD3 soluble en presencia o ausencia de los anticuerpos bloqueantes relacionados con mecanismos implicados en la cooperación celular (anti-CD154 y anti-CD40). Tras realizar un roseteo con SRBC-N se analizó la expresión de CD23 en la población E<sup>-</sup> por citometría de flujo. En la figura 17 podemos observar que los anticuerpos bloqueantes producen efecto en la inducción de la expresión de CD23 en los linfocitos B, tanto de pacientes a tiempo 0 (AR1) como tras 16 semanas (AR3) del inicio del tratamiento. Cuando se incubó con anti-CD154 el porcentaje de linfocitos B de SP CD23<sup>+</sup> en AR1 frente a AR3 fue 15% [10-38] vs 34% [26-58], p=0.04 y cuando se incubó con anti-CD40 fue 15% [5-31] vs 31% [16-40], p=0.2.

La MFI en el estudio realizado en los pacientes AR1 frente a los pacientes AR3, cuando se incubó con anti-CD154 fue 20% [16-25.25] vs 42% [26-52.75], p=0.02 y cuando se incubó con anti-CD40 fue 12% [11-16.25] vs 18.5% [14.5-31.75], p=0.09.



**Figura 17. Disminución de la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de pacientes sometidos a terapia con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7).** La disminución de la expresión de CD23 fue analizada a partir de PBMC de pacientes con AR (AR1 y AR3) sometidos a tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  (D2E7), tras incubar 18 h con anti-CD3 soluble y con distintos anticuerpos monoclonales bloqueantes de la cooperación celular. Mediante roseteo se obtuvo la población E<sup>-</sup>. Se realizó doble marcaje CD19/CD23 y se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados se representan como mediana y percentiles.

En la figura 18 se muestra el porcentaje de inhibición observado en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de los pacientes de AR a distintos tiempos del tratamiento con el monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7) y tras utilizar los distintos anticuerpos bloqueantes dirigidos frente a moléculas implicadas en mecanismos de cooperación celular. La inhibición observada en el caso de los pacientes AR1 vs pacientes AR3 fue  $33\% \pm 6.7$  vs  $30.1\% \pm 3$  cuando se incubó con anti-CD154 y  $48.6\% \pm 9.5$  vs  $44.6\% \pm 10.8$  cuando se incubó con anti-CD40.



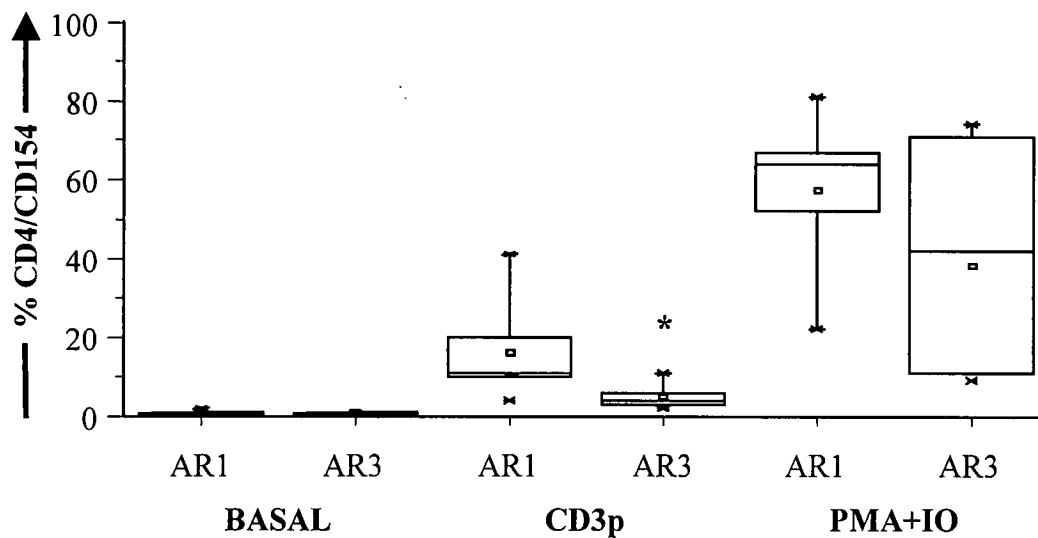
**Figura 18.** Porcentaje de inhibición en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de pacientes con AR sometidos a tratamiento con el mAb anti-TNF $\alpha$  (D2E7) tras el uso de anticuerpos bloqueantes de la cooperación celular. En las mismas condiciones que en la figura 17 se analizó la inhibición de la inducción de CD23 en la superficie de los linfocitos B, tras incubación durante 18 h PBMC en presencia de anti-CD3 y de diferentes anticuerpos bloqueantes de la cooperación celular. Los resultados se representan como la media del porcentaje de inhibición de la inducción de CD23 en cada caso  $\pm$  SD.

### 2.1.2. Análisis de la expresión de CD154 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Como se ha descrito anteriormente, los pacientes con AR presentan un mayor porcentaje de linfocitos T CD154<sup>+</sup> en LS y una mayor inducción, tras distintos estímulos, de la expresión de esta molécula de activación en los linfocitos T de SP. Por lo tanto, decidimos estudiar la influencia del tratamiento con el mAb anti-TNF $\alpha$  (D2E7) sobre la expresión basal y la inducción de esta molécula.

La inducción de la expresión de la molécula de activación CD154 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se analizó a partir de PBMC de 6 pacientes con AR obtenidos a tiempo 0 (AR1) o tras 16 semanas (AR3) del inicio del tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7). Para ello, fueron incubados PBMC en presencia de anti-CD3 pegado a plástico o de PMA + ionomicina durante 6 h. Como puede verse en la figura 19, donde se muestra el porcentaje de células dobles positivas para CD4 y para CD154, a tiempo 0 del inicio del tratamiento los linfocitos Th de pacientes con AR (AR1) expresan basalmente un 1% [1-1.25] frente a un 1% [1-1] de linfocitos Th CD154<sup>+</sup> en los pacientes tras 16 semanas del inicio del tratamiento (AR3),  $p=0.3$ . Cuando fueron incubados con anti-CD3 el porcentaje de linfocitos Th que expresan CD154 fue de 10.5% [8.5-25.25] vs 4% [2.75-7.25],  $p=0.02$  y con PMA + ionomicina fue 64% [37-74] vs 32% [10.5-71.75],  $p=0.3$ . En el estudio realizado a la semana 16 del inicio del tratamiento se vio una clara disminución de la respuesta de inducción en la expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos Th de los pacientes con AR, respecto a la observada en los pacientes a tiempo 0 del inicio del tratamiento.

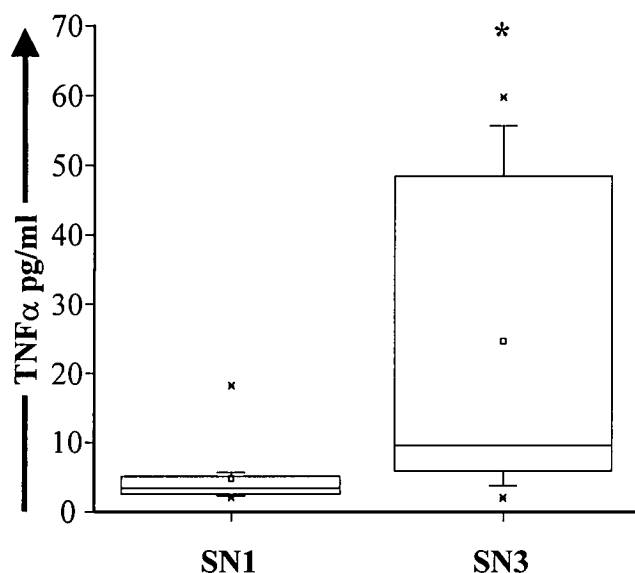
La MFI en el estudio realizado en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de AR1 frente a AR3 de forma basal fue 10% [7.75-11.75] vs 11.5% [10.5-12.25],  $p=0.2$ ; cuando fueron incubados con anti-CD3 fue 8% [7-9] vs 10.5% [9.75-11.5],  $p=0.02$  y con PMA + ionomicina fue 8% [7-9] vs 8.5% [7-11],  $p=1$ .



**Figura 19.** Expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de SP de pacientes con AR sometidos a terapia con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$ . La expresión de CD154 fue analizada a partir de PBMC, tras 6 h de incubación con anti-CD3 o con PMA + ionomicina, mediante citometría de flujo y tras realizar doble marcaje CD4/CD154. En la figura se muestra el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> que expresan en su superficie el marcador de activación CD154, representados como mediana y percentiles.

## 2.2. CUANTIFICACIÓN DE TNF $\alpha$

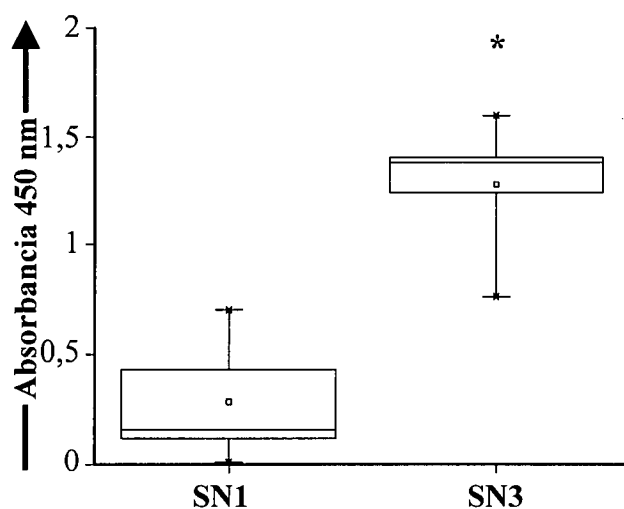
Nos propusimos analizar la presencia de TNF $\alpha$  en el suero de pacientes con AR a tiempo 0 o tras 16 semanas del inicio del tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7) (SN1 y SN3, respectivamente). Para ello, fue utilizada la técnica de ELISA y como puede observarse en la figura 20 la concentración de esta citocina es mayor en los sueros de los pacientes AR3 (SN3) que en los sueros de los pacientes AR1 (SN1), 5pg/mL [3-12] vs 52pg/mL [48-59], p=0.04.



**Figura 20. Cuantificación de TNF $\alpha$  en los sueros de los pacientes sometidos al tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7).** A partir de los sueros de pacientes con AR a diferentes tiempos del tratamiento (SN1 y SN3) se cuantificó la presencia en los mismos de TNF $\alpha$ . Para ello, se realizó un inmunoensayo y los resultados se representan como pg/ml (mediana y percentiles) tras interpolar en la curva patrón.

### 2.3. CUANTIFICACIÓN DE ICC-TNF $\alpha$

La cuantificación indirecta de la presencia de ICC positivos a la tinción con el anticuerpo monoclonal TNF $\alpha$  (D2E7) humano se realizó en los sueros de los pacientes con AR a distintos tiempos del tratamiento (SN1 y SN3). En la figura 21 se muestran las variaciones observadas en la absorbancia respecto a la tinción con TNF $\alpha$  humano, 0.2 [0.06-0.6] vs 1.4 [1-1.5],  $p=0.002$ .

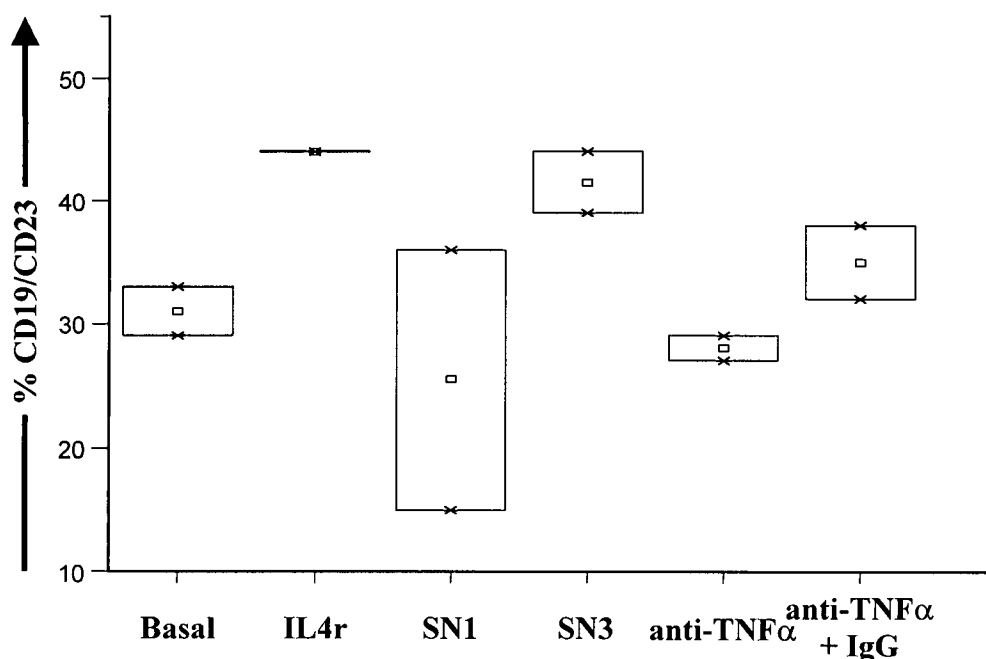


**Figura 21. Cuantificación de ICC positivos a la tinción con TNF $\alpha$  en los sueros de los pacientes con AR sometidos al tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7).** A partir de los sueros obtenidos de pacientes con AR a tiempo 0 o tras 16 semanas del inicio del tratamiento (SN1 y SN3) se analizó la presencia de ICC positivos para TNF $\alpha$  en los mismos. Para ello, se realizó un inmunoensayo enzimático y los resultados se representan como variación en la absorbancia y percentiles.



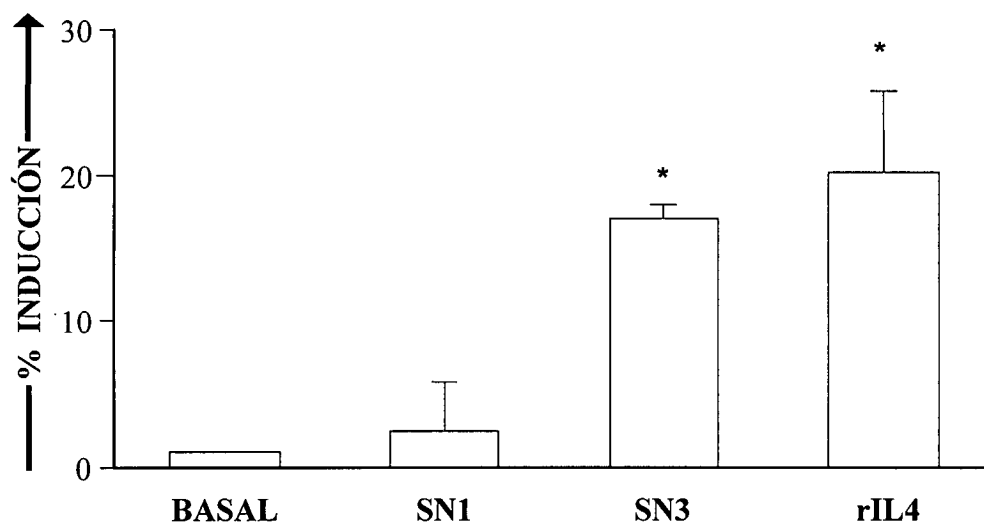
#### 2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD23 EN LOS LINFOCITOS B DE AMÍGDALA

Se estudió la variación en la expresión de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B de la población E<sup>-</sup> obtenida tras el procesamiento de amígdalas. Para ello, la población E<sup>-</sup> fue incubada con distintos estímulos solubles: IL4r, suero obtenido de los pacientes con AR a tiempo 0 (SN1) o a las 16 semanas del inicio del tratamiento (SN3) con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7) y éste mismo en presencia o en ausencia de anticuerpos anti-IgG. Como puede observarse en la figura 22, la expresión basal de CD23 en la superficie de los linfocitos B de amígdala fue 31% [29-33]. Cuando fueron incubados en presencia del anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  utilizado en el tratamiento de los pacientes con AR no se indujo la expresión de la molécula de activación CD23 en su superficie. Cuando fueron incubados en presencia de éste más anti-IgG si se produjo inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B. Esta inducción de la expresión de CD23 se observa también en presencia del suero procedente de pacientes de AR a las 16 semanas del inicio del tratamiento con el monoclonal anti-TNF $\alpha$  (D2E7) (SN3), 41% [39-44]. En presencia del suero procedente de pacientes a tiempo 0 del tratamiento (SN1) no se produjo inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B, 25% [15-36].



**Figura 22.** Inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de amígdala. La inducción en la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B, obtenidos tras el procesamiento de amígdala, se analizó a partir de la fracción E<sup>-</sup>. Los resultados fueron analizados, tras realizar doble marcaje CD19/CD23, por citometría de flujo y se representan como mediana y percentiles.

En la figura 23 se muestra el porcentaje de inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B (población E<sup>-</sup>) procedentes de amígdala.



**Figura 23. Porcentaje de inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de amígdala.** A partir de los resultados descritos en la figura 22 se analizó el porcentaje de inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B procedentes de amígdala. Los resultados se representan como porcentaje de activación  $\pm$  SD.

# **DISCUSIÓN**

## ESTUDIO 1: EXPRESIÓN DE CD23 Y CD154 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

Se analizó la expresión de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B de sangre periférica (SP) de pacientes con artritis reumatoide (AR). La inducción de la expresión de esta molécula en la superficie de los linfocitos B requiere contacto celular entre linfocitos T y linfocitos B (Mossalayi MD et al, 1997) o bien la participación de moléculas solubles (IL4). Se realizó un estudio de la expresión basal de esta molécula de activación, así como de la inducción de la expresión en la superficie de los linfocitos B a través de señales sobre los linfocitos T.

En nuestro trabajo se comprobó que la expresión basal de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP es más elevada en los pacientes con AR respecto a la observada en los controles sanos. El estímulo generado a través de los linfocitos T de SP estimulados es capaz de inducir la expresión de esta molécula de activación, siempre de forma superior en los linfocitos B de SP de los pacientes con AR respecto a los controles.

Nuestro trabajo se centró en el estudio de los mecanismos implicados en la hiperexpresión de CD23 en los linfocitos B procedentes de SP de AR, principalmente en el estudio de interacciones celulares a través de la vía de cooperación CD40-CD154. La interacción CD40-CD154 induce en los linfocitos B proliferación, diferenciación, producción de Igs, cambio de isotipo, rescate de muerte celular programada por apoptosis y formación de centros germinales. Se comprobó la implicación de esta vía en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B tras el uso de anticuerpos monoclonales bloqueantes relacionados con este mecanismo de cooperación celular (anti-CD40 y anti-CD154). En ambos casos, la inducción de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP, a través de los linfocitos T de SP estimulados, se ve afectada. En los experimentos de bloqueo con anti-CD154 y anti-CD40 se produjo una disminución significativa en la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP. Destacar que tras el uso del mAb anti-CD40 se produjo una mayor disminución en la inducción de la expresión de CD23 que tras el uso del mAb anti-CD154. Esta divergencia podría explicarse por el hecho de que CD40 es una molécula de expresión constitutiva en la superficie de los linfocitos B, mientras que CD154 es una molécula inducible, tras estímulo, en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria. Es posible, que tras la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se exprese de forma rápida en la superficie celular



CD154 proveniente del *pool* intracelular, y sea difícil de bloquear con el mAb, no así CD40 cuya expresión es constitutiva y estable tras la estimulación.

Por otro lado, se analizó la expresión basal e inducción de la expresión de la molécula de activación CD154 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de SP y de líquido sinovial (LS) de pacientes con AR tras diferentes estímulos, así como en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de SP de controles.

Respecto a la expresión de CD154 en la superficie de los linfocitos Th, se sabe que tras interactuar con la molécula CD40 presente en la superficie de los linfocitos B, monocitos y células dendríticas media efectos proinflamatorios. Esto hace pensar en un papel central de CD154 en la patología de la AR, lo cual viene apoyado por el beneficio observado en experimentación animal tras bloquear CD154 (Durie FH et al, 1993). Recientemente se ha comprobado que el 30% de los pacientes con AR presentan niveles basales elevados de CD154 y mutaciones en el promotor de este gen (Li Y et al, 1999).

Nosotros comprobamos que el porcentaje de expresión basal de esta molécula de activación, aunque bajo, fue siempre superior en los linfocitos Th de LS de pacientes con AR, esto parece indicar que aunque bajo el nivel de expresión de CD154 en los linfocitos Th de LS podría ser fisiológicamente importante en esta patología.

Por otro lado, los linfocitos Th de SP de AR tienen una gran reactividad en la inducción de la expresión de CD154 en su superficie, tras diferentes estímulos, respecto a la observada en controles, mientras que los linfocitos Th de LS responden por debajo de lo normal ante cualquier estímulo.

En experimentos *in vitro* se ha comprobado la capacidad de los linfocitos T de LS de pacientes con AR de estimular la diferenciación de los linfocitos B (Thomas R et al, 1992). Los experimentos de co-cultivos realizados en nuestro laboratorio indican que los linfocitos T de LS de AR son capaces de activar a los linfocitos B de SP de AR, medido como inducción de la expresión de CD23 en su superficie. Esto, además, apoya que la ayuda de los linfocitos T (mediado por la vía de cooperación CD40-CD154) es un evento crucial en la activación de los linfocitos B de SP en la AR. Se comprobó que tras bloquear la vía de contacto CD40-CD154, se produce una disminución en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de AR que estaban en contacto con los linfocitos T de LS.

Los linfocitos T de LS de pacientes con AR expresan CD45RO y CD45RB<sup>dim</sup> (Mason DW et al, 1990) (Firestein GS et al, 1990), lo que sugiere que previamente han

sido estimulados (Horgan KJ et al, 1994). También se caracterizan por la expresión de integrinas, lo que les confiere capacidad de migrar (Lecoanet-Henchoz S et al, 1997).

Los datos presentados demuestran que los linfocitos T, independientemente del origen de la activación en la AR, dan señales (muchas dependientes de contacto) a los linfocitos B. Hipotéticamente, los linfocitos Th de LS que expresan basalmente más CD154, podrían dejar el microambiente sinovial (participando las moléculas de adhesión) y contactar con los linfocitos B de SP a través de las moléculas CD154 y CD18, estos mecanismos dependientes de contacto junto con la contribución de IL4 producirían la marcada activación de los linfocitos B de SP de AR (visto como expresión de CD23 en su superficie). Los linfocitos T de LS responden peor a estímulos (Lotz M et al, 1986), pero en SP (cuando recirculan) responden de forma muy eficaz. Así pues, los linfocitos T de pacientes con AR parecen tener un papel principal en las alteraciones inmunológicas observadas en AR. La expresión superior de CD154, mediante mecanismos de cooperación celular, podría no sólo activar a los linfocitos B, sino también potenciar la auto-reactividad.

Los experimentos realizados en los cortes histológicos procedentes de MS de pacientes con AR nos muestran que los linfocitos B apenas se encuentran presentes. Sin embargo, si se observa la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, siendo aproximadamente un 50% de éstos positivos a la tinción de CD154.

Como queda demostrado, las moléculas CD154 y CD23 están íntimamente relacionadas entre ellas y con las alteraciones inmunológicas observadas en AR. Anticuerpos monoclonales, hacia estas moléculas, han sido probados en modelos animales de AR (Durie FH et al, 1993) (Plater-Zyberk C et al, 1995). El conocer completamente los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de CD154 y de CD23 en AR podría ayudar al diseño de nuevos aspectos terapéuticos para el tratamiento de AR.

## ESTUDIO 2: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL mAb ANTI-TNF $\alpha$ EN LA EXPRESIÓN DE CD23 Y CD154 EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

TNF $\alpha$  está directamente implicada en la patogenia de la AR y es el principal regulador de la red de citocinas proinflamatorias. Diversos estudios en animales transgénicos y *knock out* indican que la interacción TNF $\alpha$ /TNFR puede contribuir independientemente o junto a otras citocinas en la patogenia de la AR, pudiendo ser la AR el resultado de una activación mantenida de células del sistema inmune inducida por TNF $\alpha$  (Butler DM et al, 1997) (Kontoyiannis D et al, 2000).

La expresión basal de CD23, así como su inducción tras distintos estímulos, es superior en pacientes con AR. Así pues, estudiamos la influencia del tratamiento con el mAb anti-TNF $\alpha$  (D2E7) sobre la expresión basal y la inducción de esta molécula de activación de linfocitos B, CD23. Asimismo, los pacientes con AR presentan una mayor inducción en la expresión de CD154<sup>+</sup>, tras distintos estímulos, en los linfocitos T de SP. Por ello, decidimos estudiar la influencia del tratamiento con el mAb anti-TNF $\alpha$  (D2E7) sobre la expresión basal y la inducción de esta molécula en la superficie de los linfocitos Th.

Analizamos la expresión e inducción de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP, así como la expresión e inducción de la molécula de activación CD154 en la superficie de los linfocitos Th de SP de pacientes con AR sometidos a terapia con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$ .

Cuando se analizó la expresión basal de la molécula de activación CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP de pacientes con AR, a tiempo 0 o tras 16 semanas de tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ , no se observaron diferencias de expresión. Sin embargo, la inducción de la expresión de esta molécula en la superficie de los linfocitos B de SP, a través de estímulos sobre los linfocitos T de SP, aumenta significativamente tras el tratamiento con el mAb anti-TNF $\alpha$  (D2E7).

Se comprobó la implicación de la vía de cooperación CD40-CD154 en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de SP. Así, tras el uso de los diferentes anticuerpos bloqueantes de la vía de cooperación CD40-CD154 se observó una clara disminución en la inducción de la expresión de CD23 tras estímulos sobre los linfocitos T de SP. Hay que destacar, que la disminución observada en los pacientes con

AR tras 16 semanas de tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  fue menor respecto a la observada en los pacientes a día 0 del tratamiento.

Respecto a la expresión basal de la molécula de activación CD154 e inducción de ésta en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de SP tras diferentes estímulos, se observó que a mayor tiempo transcurrido del inicio del tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ , los linfocitos Th pierden esta capacidad de inducción.

Esto parece indicar la participación de otros mecanismos, además de la vía de cooperación CD40-CD154, en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B. Tras realizar un estudio de los niveles en suero de estos pacientes de la citocina TNF $\alpha$ , comprobamos que su presencia se encuentra elevada en los pacientes con AR tras 16 semanas de tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ . Nos planteamos la posibilidad de la presencia de ICC-TNF $\alpha$  en los sueros, formados por la presencia del anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  utilizado en el tratamiento de estos pacientes con AR.

En la AR los ICC formados por el FR y la IgG pueden potenciar la inflamación en las articulaciones, bien por activación del complemento o bien tras unirse a los receptores Fc $\gamma$  de los macrófagos (Edwards JCW et al, 1997). Tras comprobar la presencia de ICC-TNF $\alpha$  en los sueros de los pacientes tras 16 semanas de tratamiento nos planteamos la posibilidad de que estuviera mediada por la presencia de estos ICC en la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de estos pacientes.

Para ello, a partir de linfocitos B procedentes de amígdala cultivamos éstos en presencia de los sueros obtenidos de los pacientes a tiempo 0 o tras 16 semanas de tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ . Se pudo comprobar la existencia de factores solubles en los sueros tras 16 semanas de tratamiento que son capaces de inducir la expresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B procedentes de amígdala.



# **CONCLUSIONES**

1. Los linfocitos B de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide (AR) están hiperestimulados, como demuestra la hiperexpresión de CD23 en su superficie.
2. La hiperexpresión de CD23 en la superficie de los linfocitos B de sangre periférica de AR es, al menos en parte, T-dependiente. La vía CD40-CD154 está implicada en esta cooperación T-B.
3. En el líquido sinovial y membrana sinovial de AR existe una expresión aumentada de CD154 en la superficie de los linfocitos Th.
4. Los linfocitos T del entorno sinovial son competentes en la inducción, CD40-dependiente, de CD23 en la superficie de los linfocitos B de sangre periférica de AR. Esto apunta a una compartimentalización de la enfermedad.
5. El tratamiento con el anticuerpo monoclonal humano anti-TNF $\alpha$  (D2E7) produce un aumento en la reactividad de los linfocitos B (CD23) de sangre periférica de AR y una disminución en la reactividad de los linfocitos T (CD154). El aumento de CD23 no está mediado por la vía CD40-CD154.
6. Factores solubles, particularmente ICC TNF $\alpha$ -anti-TNF $\alpha$ , parecen implicados en el aumento en la reactividad de los linfocitos B de sangre periférica de AR.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abe T and Takeuchi T. (1998). Monoclonal antibodies as an immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nippon Rinsho*. 56(3):776-781.
- Abramson SB and Weissmann G. (1989). The mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum*. 32:1-9.
- Adorini L, Guéry JC and Trembleau S. (1996). Manipulation of the Th1/Th2 cell balance: an approach to treat human autoimmune diseases? *Autoimmunity*. 23:53-68.
- Aeschlimann AG. (1998). Rheumatoid arthritis. Conservative therapeutic possibilities today and in the future. *Orthopade*. 27(3):160-165.
- Afeltra A, Galeazzi M, Sebastiani GD, Ferri GM, Caccavo D, Addressi MA, Marcolongo R and Bonomo L. (1997). Coexpression of CD69 and HLADR activation markers on synovial fluid T lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis: a three-colour cytometric analysis. *Int J Exp Pathol*. 78(5):331-336.
- Ahmed SA, Penhale WJ and Talal N. (1985). Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*. 121:531-551.
- Alarcon GS. (1995). Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 21:589-604.
- Al-Balaghi S, Ström H and Möller E. (1984). B cell differentiation factor in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 78:7-23.
- Albani S and Roudier J. (1992). Molecular basis for the association between HLA-DR4 and rheumatoid arthritis. From the shared epitope hypothesis to a peptidic model of rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*. 25(3):209-212.
- Arnet FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Lealey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL and Hunder GG. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 31:315.
- Aruffo A, Farraynson M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M, Roberts RL, Noelle RJ, Ledbetter JA, Francke U and Ochs HD. (1993). The CD40 ligand, gp39 is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper Ig-M syndrome. *Cell*. 72:291-300.
- Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU and Bonnefoy JY. (1992). CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature*. 358:505-507.
- Badolato R and Oppenheim JJ. (1996). Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 26(2):526-538.
- Baier-Bitterlich G, Uberall F, Bauer B, Fresser F, Watcher H, Grunicke H, Utermann G, Altman A and Baier G. (1996). Protein Kinase C isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 16:1842-1850.
- Banner DW, D Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H and Lesslauer W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF $\beta$  complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*. 73:431-445.
- Bazil V and Strominger JL. (1993). CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(9):3792-3796.

- Beacock-Sharp H, Young JL and Gaston JS. (1998). Analysis of T cell subsets present in the peripheral blood and synovial fluid of reactive arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* 57(2):100-106.
- Behrens TW and Goodwind JS. (1989). Glucocorticoids. In: *Arthritis and Allied Conditions*. McCarty DJ (editor). Lea&Febiger.
- Berridge MJ. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361:315-325.
- Berthelot JM, Bataille R, Maugars Y and Prost A. (1996). Rheumatoid arthritis as a bone marrow disorder. *Semin Arthritis Rheum.* 26(2):505-514.
- Beutler B, Mahoney J, LeTrang N, Pekala P and Cerami A. (1985). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med.* 161:984-995.
- Beutler BA. (1999). The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol.* 26 Suppl 57:16-21.
- Billingham ME, Hicks C and Carney S. (1990). Monoclonal antibodies and arthritis. *Agents Actions.* 29(1-2):77-87.
- Boers M and Ramsden M. (1991). Long acting drug combinations in RA: a formal overview. *J Rheumatol.* 18:316-324.
- Bonnefoy JY, Aubry JP, Gauchat JF, Graber P, Life P, Flores-Romo L and Mazzei G. (1993). Receptors for IgE. *Curr Opin Immunol.* 5:944-949.
- Bonnefoy JY, Aubry JP, Peronne C, Wijdenes J and Banchereau J. (1987). Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD23 is a low affinity receptor for IgE. *J Immunol.* 38:2970-2978.
- Borigini MJ and Paulus HE. (1995). Innovative treatment approaches for rheumatoid arthritis. Combination therapy. *Baillieres Clin Rheumatol.* 9(4):689-710.
- Borzi RM, Arfilli L, Focherini MC, Pulsatelli L and Meliconi R. (1993). Circulating tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 69(1):39-43.
- Brennan FM, Maini RN and Feldmann M. (1998). Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 20(1-2):133-147.
- Bresnihan B, Lookabaugh J, Witt K and Musikic P. (1996). Treatment with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhUL-1ra) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39:S73.
- Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF and Ware CF. (1993). Lymphotoxin  $\beta$ , a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell.* 72:847-856.
- Buckley MG, Walters C, Wong WM, Cawley MI, Ren S, Schwartz LB and Walls AF. (1997). Mast cell activation in arthritis: detection of alpha- and beta-tryptase, histamine and eosinophil cationic protein in synovial fluid. *Clin Sci (Colch).* 93(4):363-370.
- Burmester GR, Jahn B, Gramatzki M, Zacher I and Kalden JR. (1984). Activated T cells in vivo and in vitro: different phenotypic expression of Tac and Ia antigens in patients with inflammatory joint diseases and normal in vitro activated T cells. *J Immunol.* 133:1230-1234.
- Butler DM, Malfait AM, Mason LJ, Warden PJ, Kollias G, Maini RN, Feldmann M and Brennan FM. (1997). DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J Immunol.* 159:2867-2876.

- Callard RE, Armitage RJ, Fanslow W and Spriggs MK. (1993). CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today*. 14:559-564.
- Campion GV, Lebsack ME, Lookabaugh J, Gordon G and Catalano M. (1996). Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 32:964-973.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N and Williamson B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72:3666-3670.
- Chan AC, Iwashima M, Turk CW and Weiss A. (1992). Zap-70: a 70 kD protein-tyrosine kinase that associates with the TCR  $\zeta$  chain. *Cell*. 71:649-662.
- Charles PJ, Elliott MJ and Feldmann M. (1995). Development of anti-dsDNA antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated with a quimeric monoclonal antibody to TNF alpha. *EULAR J*. 24:B114.
- Chen PP, Fong S and Carson DA. (1987). Rheumatoid factor. *Rheum Dis Clin North Am*. 13:545-568.
- Chomarat P, Briolay J, Banchereau J and Miossec P. (1993). Increased production of soluble CD23 in rheumatoid arthritis, and its regulation by interleukin-4. *Arthritis Rheum*. 36:234-242.
- Chu CQ, Field M, Feldmann M and Maini RN. (1991). Localization of tumor necrosis factor  $\alpha$  in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 34:1125-1132.
- Clark EA and Ledbetter JA. (1994). How B and T cells talk to each other. *Nature*. 367:425-428.
- Constant SL and Bottomly K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*. 15:297-322.
- Crabtree GR and Clipstone NA. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem*. 63:1045-1083.
- Friedman SM, Jover JA, Chartash EK and Crow MK. (1986). Direct T helper-B cell interactions induce an early B cell activation antigen. *J Exp Med*. 164:1773-1778.
- Crow MK, Kushner B, Jover JA, Friedman S, Mechanic SE and Stohl W. (1989). Human peripheral blood T helper cell-induced B cell activation results in B cell surface expression of the CD23 (BLAST-2) antigen. *Cell Immunol*. 121:99-112.
- Cunnane G, Madigan A, Fitzgerald O and Bresnihan B. (1996). Treatment with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1ra) may reduce synovial infiltration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 29:S245.
- Cush JJ, Pietschmann P, Oppenheimer-Marks N and Lipsky PE. (1992). The intrinsic migratory capacity of memory T cells contributes to their accumulation in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 35:1434-1444.
- Cutolo M, Sulli A, Barone A, Serio B and Accardo S. (1993). Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 11(3):331-339.
- Darnay BG and Aggarwal BB. (1997). Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol*. 61(5):559-566.
- Davey EJ, Thyberg J, Conrad DH and Severinson EJ. (1998). Regulation of cell morphology in B lymphocytes by IL-4: evidence for induced cytoskeletal changes. *J Immunol*. 160:5366-5373.

- Davis LS, Kavanaugh AF, Nichols LA and Lipsky PE. (1995). Induction of persistent T cell hyporesponsiveness in vivo by monoclonal antibody to ICAM-1 in patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 154:3525-3537.
- Davis LS and Lipsky PE. (1998). Disordered differentiation of memory T cells in rheumatoid arthritis. *Rev Rhum Engl Ed.* 65(5):291-296.
- De France T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, Takebe Y, Yokota T, Lee F, Arai K, DeVries J and Banchereau J. (1987). Human recombinant interleukin 4 induces Fc receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med.* 165:1459-1467.
- Delespesse G, Safarti M, Wu CY, Fournier S and Letellier M. (1992). The low-affinity receptor for IgE. *Immunol Rev.* 125:77-97.
- Deleuran BW, Chu CQ, Field M, Brennan FM, Mitchell T, Feldmann M and Maini RN. (1992). Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35:1170-1178.
- Desroches C, Rigal D and Andreoni C. (1991). Regulation and functional involvement of distinct determinants of leucocyte function associated antigen 1 (LFA-1) in T-cell activation in vitro. *Scand J Immunol.* 33:277-286.
- Dolhain RJ, Ter Haar NT, De Kuiper R, Nieuwenhuis IG, Zwinderman AH, Breedveld FC and Miltenburg AM. (1998). Distribution of T cells and signs of T-cell activation in the rheumatoid joint: implications for semiquantitative comparative histology. *Br J Rheumatol.* 37(3):324-330.
- Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA and Noelle RJ. (1993). Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science.* 261:1328-1330.
- Edwards JC, Blades S and Cambridge G. (1997). Restricted expression of Fc gamma RIII (CD16) in synovial and dermis: implications for tissue targeting in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 108:401-406.
- Ehrenstein MR, McSweeney E, Swana M, Worman CP, Godstone AH and Isenberg DA. (1993). Appearance of anti-DNA antibodies in patients treated with interferon- $\alpha$ . *Arthritis Rheum.* 36:279-280.
- Elewaut D, De Keyser F, De Wever N, Baeten D, Van Damme N, Verbruggen G, Cuvelier C and Veys EM. (1998). A comparative phenotypical analysis of rheumatoid nodules and rheumatoid synovium with special reference to adhesion molecules and activation markers. *Ann Rheum Dis.* 57:480-486.
- El-Gabalawy H, Canvin J, Ma GM, Van der Vieren M, Hoffman P, Gallatin M and Wilkins J. (1996). Synovial distribution of alpha d/CD18, a novel leukointegrin. Comparison with other integrins and their ligands. *Arthritis Rheum.* 39:1913.
- Eliaou JF, Andary M, Favier F, Carayon P, Poncelet P, Sany J, Brochier J and Clot J. (1988). Increase of class II HLA molecules on the membrane of B lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 1:217-222.
- Elliott MJ, Feldmann M and Maini RN. (1995). TNF alpha blockade in rheumatoid arthritis: rationale, clinical outcomes and mechanisms of action. *Int J Immunopharmacol.* 17(2):141-145.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghrayeb J and Woody J. (1993). Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to TNF $\alpha$ . *Arthritis Rheum* 36:1681-1690.
- Evans TI, Han J, Singh R and Moxley G. (1995). The genotypic distribution of shared-epitope DRB1 alleles suggests a recessive mode of inheritance of the rheumatoid arthritis disease-susceptibility gene. *Arthritis Rheum.* 38:1754-1761.

- Fanger CM, Hoth M, Crabtree GR and Lewis RS. (1995). Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J Cell Biol.* 131:655-667.
- Feldmann M, Brennan FM and Maini R. (1998). Cytokines in autoimmune disorders. *Int Rev Immunol.* 17(1-4):217-228.
- Feldmann M, Brennan FM and Maini RN. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14:397-440.
- Feldmann M, Brennan FM, Williams RO, Elliott MJ and Maini RN. (1995-96). Cytokine expression and networks in rheumatoid arthritis: rationale for anti-TNF alpha antibody therapy and its mechanism of action. *J Inflamm.* 47(1-2):90-96.
- Fernández-Gutiérrez B, de Miguel S, Morado C, Hernández-García C, Bañares A and Jover JA. (1998). Defective early T and T-dependent B cell activation in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 7:314-322.
- Fernández-Gutiérrez B, Hernández-García C, Bañares A and Jover JA. (1994). CD23 hyperexpression in Rheumatoid Arthritis: Evidence for a B cell hyperresponsiveness to cognate and non-cognate T-cell signals. *Clin Immunol Immunopathol.* 72:321-327.
- Firestein GS and Paine MM. (1992). Stomelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol.* 140:1309-1314.
- Firestein GS and Zvaifler NJ. (1987). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. A critical assessment of the role of autologous stimulation in the perpetuation of rheumatoid synovitis. *Rheum Dis Clin North Am.* 13(3):447-461.
- Firestein GS and Zvaifler NJ. (1990). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum.* 33:768-773.
- Fishwild DM and Strand V. (1994). Administration of an anti-CD5 immunoconjugate to patients with rheumatoid arthritis: effect on peripheral blood mononuclear cells and in vitro immune function. *J Rheumatol.* 21(4):596-604.
- Fournel M, Davidson D, Weil R and Veillette A. (1996). Association of tyrosine protein kinase ZAP-70 with the protooncogen product p120<sup>c-cbl</sup> in T lymphocytes. *J Exp Med.* 183:301-306.
- Gaston JS. (1998). Role of T-cells in the development of arthritis. *Clin Sci (Colch).* 95(1):19-31.
- Gay S. (1999). Rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 11(3):185-187.
- Gordon J. (1991). In: *Monographs in Allergy* (Hanson LA and Shakib F, eds). pp29, Karger.
- Goronzy JJ and Weyand CM. (1995). T and B cell-dependent pathways in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 7(3):214-221.
- Goronzy JJ, Zettl A and Weyand CM. (1998). T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Int Rev Immunol.* 17(5-6):339-363.
- Goto M. (1999). Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ryumachi.* 39(1):39-46.
- Gottlieb AB, Fu SM, Yu DTY, Wang CY, Halper JP and Kunkel HG. (1979). The nature of the stimulatory cell in human allogeneic and autologous MLC reactions; role of isolated IgM-bearing B cells. *J Immunol.* 123:1497-1503.
- Gray JD and Horwitz DA. (1995). Activated human NK cells can stimulate resting B cells to secrete immunoglobulins. *J Immunol.* 154:5656-5664.



- Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP, et al. (1984). Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*. 312:721-724.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 83:793-802.
- Grewal IS and Falvell RA. (1997). The CD40 ligand. At the center of the immune universe? *Immunol Res*. 16:59-70.
- Grubb R, Grubb A, Kjellen L, Lycke E and Man P. (1999). Rheumatoid arthritis a gene transfer disease. *Exp Clin Immunogenet*. 16(1):1-7.
- Hale G, Xia MQ, Tighe HP, Dyer MJS and Waldmann H. (1990). The CAMPATH-1H antigen (CDw52). *Tissue Antigens*. 35:118-127.
- Hara M, Kitani A, Harigai M, Suzuki K, Hirose T, Kawakami M, Kawagae M and Nakamura H. (1991). Discrete association of CD3 and CD4 molecules in T-cell stimulation acting through the autologous mixed lymphocyte reaction and the TCR/CD3-cell receptor complex in human. *Scand J Immunol*. 33:141-149.
- Harigai M, Hara M, Nakazawa S, Fukasawa C, Ohta S, Sugiura T, Inoue K and Kashiwazaki S. (1999). Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes. *J Rheumatol*. 26(5):1035-1043.
- Hellen EA, Rowlands DC, Hansel TT, Kitas GD and Crocker J. (1991). Immunohistochemical demonstration of CD23 expression on lymphocytes in rheumatoid synovitis. *J Clin Pathol*. 44:293-296.
- Herberman RB. (1982). NK Cells and Other Natural Effector Cells. New York: Academic. 912 pp.
- Hernández-García C, Fernández-Gutiérrez B, Morado I, Bañares A and Jover JA. (1996). The CD69 activation pathway in rheumatoid arthritis synovial fluid T cells. *Arthritis Rheum*. 39:1277-1286.
- Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, Aruffo A. (1995). Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med*. 182:33-40.
- Horgan KJ, Tanaka Y, Luce GE, van Seventer GA, Nutman TB and Shaw S. (1994). CD45RB expression defines two interconvertible subsets of human CD4<sup>+</sup> T cells with memory function. *Eur J Immunol*. 24:1240-1243.
- Horneff G, Burmester GR, Emmrich F and Kalden JR. (1991). Treatment of rheumatoid arthritis with an anti-CD4 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum*. 34:129-140.
- Husby G and Williams RC. (1988). Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 1:363-371.
- Iannone F, Corrigall VM, Kingsley GH and Panayi GS. (1994). Evidence for the continuous recruitment and activation of T cells into the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 24(11):2706-2713.
- Isomaki P and Punnonen J. (1997). Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Med*. 29(6):499-507
- Iwashima M, Irving BA, Vanoers NS, Chan AC and Weiss A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*. 263:1136-1139.
- Janeway CA and Bottomly K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*. 76:275-285.

- June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA and Samelson LE. (1990). Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol.* 144:1591-1599.
- Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, Ziegler-Heitbrock HW, Nedospasov SA, Breedveld FC and Verweij CL. (1998). Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med.* 4(11):724-733.
- Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC and Pober JS. (1995). CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:4342-4346.
- Katzav S, Sutherland M, Packham G, Yi T and Weiss A. (1994). The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-vav. *J Biol Chem.* 269:32579-32585.
- Kavanaugh AF, Davis LS, Nichols LA and Lipsky PE. (1995). Retreatment of rheumatoid arthritis patients with an anti-ICAM-1 monoclonal. *Arthritis Rheum.* 38:S280.
- Kavanaugh AF, Davis LS, Nichols LA, Norris SH, Rothelein R, Scharschmidt LA and Lipsky PE. (1994). Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum.* 37:992-999.
- Keysser G, Alpermann U and Burmester GR. (1998). Anti-CD4 therapy in treatment of rheumatoid arthritis have the die been cast? *Z Rheumatol.* 57(5):320-325.
- Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A and Hollenbaugh D. (1995). Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol.* 155:4917-4925.
- Kirkham BW, Thien F, Pelton BK, Pitzalis C, Amlot P, Denman AM and Panayi GS. (1992). Chimeric CD7 monoclonal antibody therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 19:1348-1352.
- Klausner RD and Samelson LE. (1991). T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell.* 64:875-878.
- Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasumuna T and Nishioka K. (1999). Apomodulation as a novel therapeutic concept for the regulation of apoptosis in rheumatoid synoviocytes. *Curr Opin Rheumatol.* 11(3):188-193.
- Kontoyiannis D and Kollias G. (2000). Accelerated autoimmunity and lupus nephritis in NZB mice with an engineered heterozygous deficiency in tumor necrosis factor. *Eur J Immunol.* 30:2038-2047.
- Kotzin BL, Leung DYM, Kappler J and Marrack P. (1993). Superantigens and their potential role in human disease. *Adv Immunol.* 54:99-166.
- Ksontini R, MacKay SL and Moldawer LL. (1998). Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg.* 133(5):558-567.
- Kuhn R, Rajewsky K and Muller W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science.* 254:707-710.
- Kumagai S, Ishida H, Iwai K, Tsubata T, Umehara H, Ozaki S, Suginoshita T, Araya S and Imura H. (1989). 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.* 78:348-353.

- Kyle V, Coughlan RJ, Tighe H, Waldmann H and Hazleman BL. (1989). Beneficial effect of monoclonal antibody to interleukin 2 receptor on activated T cells in rheumatoid arthritis. *Annu Rheum Dis.* 48:428-429.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J and Woodgett JR. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 369:156-160.
- Laffón A, García-Vicuña R, Humbría A, Postigo AA, Corbí AL, de Landázuri MO and Sánchez-Madrid F. (1991). Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 88(2):546-552.
- Laman JD, de Smet BJ, Schoneveld A and van Mersus M. (1997). CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Immunol Today.* 16:272-277.
- Lane P, Traunnecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A and Gray D. (1992). Activated human T cells express a ligand for the human B-cell associated antigen CD40 which participates in T-cell dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 22:2573-2578.
- Lecoanet-Henchoz S, Gauchat JF, Aubry JP, Graber P, Life P, Paul-Eugene N, Ferrua B, Corbi AL, Dugas B, Plater-Zyberk C, et al. (1995). CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity.* 3:119-125.
- Lecoanet-Henchoz S, Plater-Zyberk C, Graber P, Gretener D, Aubry JP, Conrad DH and Bonnefoy JY. (1997). Mouse CD23 regulates monocyte activation through an interaction with the adhesion molecule CD11b/CD18. *Eur J Immunol.* 27:2290-2294.
- Lederman S, Yellin MJ, Inghirami G, Lee JJ, Knowles DM and Chess L. (1992a). Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. *J Immunol.* 149:3817-3826.
- Lederman SM, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ and Chess L. (1992b). Identification of a novel surface protein on activated CD4<sup>+</sup> T cells that induces contact dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med.* 175:1091-1101.
- Lemmel EM, Brackertz D, Franke M, Gaus W, Hartl PW, Machalke U, Mielke H, Obert HJ, Peter HH, Sieper J, Sprekeler R and Stierle H. (1988). Results of multicenter placebo-controlled double-blind randomized phase III clinical study of treatment of rheumatoid arthritis with recombinant interferon-gamma. *Rheumatol Int.* 8:87-93.
- Lettesjö H, Nordström E, Ström H, Nilsson B, Glinghammar B, Dahlstedt L and Möller E. (1998). Synovial fluid cytokines in patients with rheumatoid arthritis or other arthritic lesions. *Scand J Immunol.* 48(3):286-292.
- Li Y, Guang-Rong S and Crow MK. (1999). An altered nucleotide sequence in the immediate promoter region of CD40 Ligand is associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42:S233.
- Lindhout E, van Eijk M, van Pel M, Lindeman J, Dinant HJ and de Groot C. (1999). Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells. *J Immunol.* 15 162(10):5949-5956.
- Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JPB, Luo C, Perrino BA and Rao A. (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem.* 271:10884-10891.
- Lorenz HM, Antoni C, Valerius T, Repp R, Grünke M, Schwerdtner N, Nüsslein H, Woody J, Kalden JR and Manger B. (1996). In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects. *J Immunol.* 156:1646-1653.

- Lorenz HM and Kalden JR. (1999). Biologic agents in the treatment of inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 11(3):179-184.
- Lotz M, Tsoukas CD, Robinson CA, Dinarello CA, Carson DA and Vaughan JH. (1986). Basis for the defective responses of rheumatoid arthritis synovial fluid lymphocytes to anti-CD3 (T3) antibody. *J Clin Invest.* 78:713-721.
- MacDonald KPA, Nishioka Y, Lipsky PE and Thomas R. (1997). Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 100:2404-2414.
- Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS and Libby P. (1997). Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:2516-2520.
- Machold KP, Neumann K and Smolen JS. (1992). Recombinant human interferon gamma in the treatment of rheumatoid arthritis. *Annu Rheum Dis.* 51:1039-1043.
- Makhatadze NJ. (1998). Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. *Hum Immunol.* 59(9):571-579.
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV and Wallach D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL1. *Nature.* 385:540-544.
- Mannik M, Nardella FA and Sasso EH. (1988). Rheumatoid factors in immune complexes of patients with rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 10(2-3):215-230.
- Marshall LS, Shepherd DM, Ledbetter JA, Aruffo A and Noelle RJ. (1994). Signaling events during helper T cell-dependent B cell activation. *J Immunol.* 152:4816-4825.
- Mason DW and Powrie F. (1990). Memory CD4<sup>+</sup> T cells in man form two distinct subpopulations, defined by their expression of isoforms of the leucocyte common antigen CD45. *Immunology.* 70:427-433.
- McFarland ED, Hurley TR, Pingel JT, Sefton BM, Shaw A and Thomas ML. (1993). Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:1402-1406.
- McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M and Liew FY. (1997). Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 3:189-195.
- Miossec P and van den Berg W. (1997). Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum.* 40(12):2105-2115.
- Morado-Quiñoa I, Fernández-Gutiérrez B, Hernández-García C, Bañares A, Collado P, Candelas G, Blanco M and Jover JA. (1996). Rheumatoid arthritis: mechanisms involved in the abnormal T/B cognate interactions. *Arthritis Rheum.* 39 (Suppl):61.
- Moreland LW, Bucy PR, Jackson B, James T and Koopman WJ. (1996). Long-term (5 years) follow-up of rheumatoid arthritis patients treated with a depleting anti-CD4 monoclonal antibody, cM-T412. *Arthritis Rheum.* 39:S244.
- Moreland LW, Sewell KL, Trentham DE, Bucy PR and Sullivan WF. (1995). Interleukin-2 diphtheria fusion protein (DAB486IL2) in refractory rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial with open-label extension. *Arthritis Rheum.* 38:1177-1588.
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell

- J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD, et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Nature*. 385:733-736.
- Mossalayi MD, Arock M and Debre P. (1997). CD23/Fc epsilon RII: signaling and clinical implication. *Int Rev Immunol*. 16:129-146.
- Muller B, Gimsa U, Mitchison NA, Radbruch A, Sieper J and Yin Z. (1998). Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol*. 20(1-2):181-196.
- Nagata S and Golstein P. (1995). The Fas death factor. *Science*. 267:1449-1456.
- Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*. 88:355-365.
- Nakao H, Eguchi K, Kawakami A, Migita K, Otsubo T, Ueki Y, Shimomura C, Tezuka H, Mastsunaga M, Maeda K and Nagataki S. (1989). Increment of Tal positive cells in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 16:904-910.
- Noelle RJ, Ledbetter JA and Aruffo A. (1992). CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today*. 13:431-433.
- Noh DY, Shin SH and Rhee SG. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochem Biophys Acta*. 1242:99-113.
- Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A and Crabtree GR. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature*. 369:497-502.
- Olsen NJ and Jasin HE. (1985). Synthesis of rheumatoid factor in vitro: Implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 15:146-156.
- Oppenheimer-Marks N and Lipsky PE. (1996). Adhesion molecules as targets for the treatment of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol*. 79:203-210.
- Padula SJ, Clark RB and Korn JH. (1986). Cell-mediated immunity in rheumatic disease. *Hum Pathol*. 17(3):254-263.
- Paliard X, West SG, Lafferty JA, Clements JR, Kappler JW, Marrack P and Kotzin BL. (1991). Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science*. 253:325-329.
- Palmer DG. (1995). The anatomy of the rheumatoid lesion. *Br Med Bull*. 51:286-295.
- Panayi GS, Lanchbury JS and Kingly GH. (1992). The importance of T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 35:729-735.
- Parker DC. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol*. 11:331.
- Pasparakis M, Alexopoulou L, Douni E and Kollias G. (1996). Tumour necrosis factors in immune regulation: everything that's interesting is...new. *Cytokine Growth Factor Rev*. 7:223-229.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB and Goeddel DV. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 312:724-729.
- Persselin JE. (1991). Diagnosis of rheumatoid arthritis. Medical and laboratory aspects. *Clin Orthop*. (265):73-82.
- Pincus T and Callahan LF. (1986). Taking mortality in rheumatoid arthritis seriously: predictive markers, socioeconomic status and comorbidity. *J Rheumatol*. 13:841-845.

- Plater-Zyberk C and Bonnefoy JY. (1995). Marked amelioration of established collagen-induced arthritis by treatment with antibodies to CD23 in vivo. *Nat Med.* 1:781-785.
- Poudrier J and Owens T. (1994). Co-stimulation by anti-immunoglobulin is required for B cell activation by CD40L low T cells. *Eur J Immunol.* 24:2993-2999.
- Putney JW. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* 11:611-624.
- Racadot E, Wijdenes J and Wendling D. (1992). Immunological follow-up of 17 patients with rheumatoid arthritis treated in vivo with an anti-T CD4<sup>+</sup> monoclonal antibody (B-F5). *Clin Exp Rheumatol.* 10(4):365-374.
- Rao A. (1994). NF-ATp: a transcription factor required for the coordinate induction of several cytokine genes. *Immuno Today.* 15:274-281.
- Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA and Goodnow CC. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell.* 87:319-329.
- Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E and Flavell RA. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL4 producing CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med.* 185:461-469.
- Robak T and Gladalska A. (1997). Cytokines in rheumatoid arthritis. *Postepy Hig Med Dosw.* 51(6):621-636.
- Sánchez-Mateos P and Sánchez-Madrid F. (1991). Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur J Immunol.* 21:2317-2325.
- Sander O, Rau R, van Riel P, van de Putte L, Hasler F, Baudin M, Lüdin E, McAuliffe T, Dickinson S, Kähny MR et al. (1996). Neutralization of TNF by lenercept (TNFR55-IgII, Ro 45-2081) in patients with rheumatoid arthritis treated for three months: Results of a European phase II trial. *Arthritis Rheum.* 39:S242.
- Sarosi GA, Thomas PM, Egerton M, Phillips AF, Kim KW, Bonvini E and Samelson LE. (1992). Characterization of the T cell antigen receptor-p60fyn protein tyrosine kinase association by chemical cross-linking. *Int Immunol.* 4:1211-1217.
- Shaw AS, Chalupny J, Whitney JA, Hammond C, Amrein KE, Kavathas P, Sefton BM and Rose JK. (1990). Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediated-binding to the amino-terminal domain of the p56<sup>lck</sup> tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 10:1853-1862.
- Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T and Nobunaga M. (1993). The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by sinovial cells and endotelial cells. *Clin Exp Immunol.* 94:145-149.
- Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WER and Silman AJ. (1993). Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol.* 32:903-907.
- Smith RA and Baglioni C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem.* 262:6951-6954.
- Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D and Strominger JL. (1986). Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:8699-8702.
- Springer TA. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346:425-434.

- Springer TA. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 76:301-314.
- Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sun S and Anderson T. (1991). The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and  $\alpha$ 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell*. 66:1133-1144.
- Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka-Benke A, Gal A, Kunaver M, Zenz P and Smolen JS. (1999). Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 38(3):202-213.
- Stout R and Suttles J. (1996). The many roles of CD40-CD40L interactions in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today*. 17:487-492.
- Stout R. (1993). Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate signals. *Curr Opin Immunol*. 5:398-403.
- Strand V, Lipsky PE, Cannon GW, Calabrese LH, Wisenhutter C, Cohen SB, Olsen NJ, Lee ML, Lorenz TJ and Nelson B. (1993). Effects of administration of an anti-CD5 plus immunoconjugate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 36:620-630.
- Striebich CC, Falta MT, Wang Y, Bill J and Kotzin BL. (1998). Selective accumulation of related CD4+ T cell clones in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 15;161(8):4428-4436.
- Stüber E, Strober W and Neurath M. (1996). Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin-12 secretion. *J Exp Med*. 183:693-698.
- Szamel M and Resch K. (1995). T-cell antigen receptor induced signal transduction pathways. Activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur J Biochem*. 228:1-15.
- Szekanecz Z and Szegedi G. (1998). Cytokines in rheumatoid arthritis: new therapeutic possibilities. *Orv Hetil*. 5 139(14):819-823.
- Tao X and Stout RD. (1993). T-cell mediated cognate signaling of nitric oxide production by macrophages. *Eur J Immunol*. 23:2916-2921.
- Tetta C, Camussi G, Modena V, Di Vittorio C and Baglioni C. (1990). Tumor necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 49:665-667.
- Thomas R, McIlraith M, Davis LS and Lipsky PE. (1992). Rheumatoid synovium is enriched in CD45RBdim mature memory cells that are potent helpers for B cell differentiation. *Arthritis Rheum*. 35:1455-1465.
- Thomas R and Quinn C. (1996). Functional differentiation of dendritic cells in rheumatoid arthritis: role of CD86 in the synovium. *J Immunol*. 15 156(8):3074-3086.
- Thompson PW, Kirwan JR and Barnes CG. (1985). Practical results of treatment with disease-modifying drugs. *Br J Rheumatol*. 24:167-175.
- Thomson W, Harrison B, Olliver B, Wiles N, Payton T, Barret J, Symons D and Silman A. (1999). Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis. Results from a large, population-based study. *Arthritis Rheum*. 42:757-762.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF and Cerami A. (1987). Anti-cachetin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 330:662-664.

- Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Pelmutter RM and Littman DR. (1990). Interaction of the unique N-terminal region of the tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> with the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell*. 60:755-765.
- Van Kooten C and Banchereau J. (1997). Functional role of CD40 and its ligand. *Int Arch Allergy Immunol*. 113(4):393-399.
- Van Lier R, Bouwer M, Groot E, Kramer I, Aarden L and Verhoeven A. (1991). T cell receptor/CD3 and CD28 use distinct intracellular signalling pathways. *Eur J Immunol*. 21:1775-1778.
- Van Oers NS, Killeen N and Weiss A. (1996). Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and Zap-70 in murine thymocytes. *J Exp Med*. 183:1053-1062.
- Van Roon JAG, van Roy JLA, Gmelig-Meyling FHJ, Lafeber FPJG and Bijlsma JWJ. (1996). Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum*. 39:829-835.
- Veillette A, Bookman MA, Horak EM and Bolen JB. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56<sup>lck</sup>. *Cell*. 55:301-308.
- Veys EM, Menkes CJ and Emery P. (1997). A randomized, double-blind study comparing twenty-four-week treatment with recombinant interferon gamma versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 40:62-68.
- Vilcek J and Lee TH. (1991). Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*. 266:7313-7316.
- Vogel LB and Fujita DJ. (1993). The SH3 domain of p56<sup>lck</sup> is involved in binding to phosphatidylinositol 3'-kinase from T lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 13:7408-7417.
- Wakisaka S, Suzuki N, Takeba Y, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Takeno M, Saito N, Yokoe T, Kaneko A, Asai T and Sakane T. (1998). Modulation by proinflammatory cytokines of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 114:119-128.
- Weinblatt ME, Maddison PJ, Bulpitt KJ, Hazleman BL, Urowitz MB, Sturrock RD, Coblyn JS, Maier AL, Spreen WR and Manna VK. (1995). CAMPATH-1H, a humanized monoclonal antibody, in refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 38:1589-1594.
- Wendling D, Radacot E and Wijdenes J. (1993). Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody. *J Rheumatol*. 20:259-262.
- Wernick RM, Lipsky PE, Marban-Arcos E, Maliakkal JJ, Edelbaum D and Ziff M. (1985). IgG and IgM rheumatoid factor synthesis in rheumatoid synovial membrane cell cultures. *Arthritis Rheum*. 28:742-752.
- Weyand CM, Hicok KC, Conn DL and Goronzy JJ. (1992a). The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 117:801-806.
- Weyand CM, Xie C and Goronzy JJ. (1992b). Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 89:2033-2039.
- Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R and Xu Q. (1995). Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today*. 16:27-33.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO and Duff GW. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 267:1449-1456.



- Wollenhaupt J, Schnarr S and Kuipers JG. (1998). Bacterial antigens in reactive arthritis and spondylarthritis. Rational use of laboratory testing in diagnosis and follow-up. *Baillieres Clin Rheumatol.* 12(4):627-647.
- Wu Y, Xu J, Shinde S, Grewal IS, Henderson T, Flavell RA and Liu Y. (1995). Rapid induction of a novel costimulatory activity on B cells by CD40 ligand. *Curr Biol.* 5:1303-1311.
- Yang Y and Wilson JM. (1996). CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signalling through CD40. *Science.* 278:1862-1864.
- Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D and Chess L. (1995). Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med.* 182:1857-1864.
- Yukawa K, Kikutani H, Oowaki H, Yamasaki K, Yokota A, Nakamura H, Barsumian EL, Hardy RR, Suemura M and Kishimoto T. (1987). A B-cell specific differentiation antigen, CD23, is a receptor for IgE (Fc epsilon R) on lymphocytes. *J Immunol.* 38:2576-2580.
- Zvaifler NJ and Firestein GS. (1994). Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 37:783-789.

