

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE IL-12 EN
UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE
INJERTO CONTRA EL HUÉSPED**

FRANCISCA GALLEGO VALADÉS

Universidad Autónoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE IL-12 EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA EL HUÉSPED

Memoria presentada por Francisca Gallego Valadés para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona, habiendo realizado el programa de doctorado de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, del Departamento de Bioquímica y Biología Celular de la mencionada Universidad.

Este trabajo ha sido realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo, bajo la dirección de la Dra. Carmen Gelpí Sabater y tutorizada por el Dr. Jordi Ordóñez-Llanos, del Departamento de Bioquímica y Biología Celular de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Directora

Dra. Carmen Gelpí

Tutor

Dr. Jordi Ordóñez

Autora

Francisca Gallego

Barcelona, Febrero del 2005

A mí padre y a mi madre

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas sin las cuales este trabajo, seguro, no hubiera sido posible. Y en especial a aquellas, que me ayudaron sin esperar nada a cambio. A todas ellas, que han sido muchas, mi más sincero agradecimiento.

Paquí

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. AUTOTOLERANCIA	1
1.1 Mecanismos de autotolerancia.....	2
2. AUTOINMUNIDAD.....	5
2.1 Factores que intervienen en el desarrollo de una enfermedad autoinmune.....	6
2.1.1 Factores genéticos.....	7
2.1.2 Factores ambientales.....	12
2.2 Mecanismos patogénicos de las enfermedades autoinmunes.....	14
2.2.1 Mecanismos mediados por anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie.....	16
2.2.2 Mecanismos mediados por inmunocomplejos.....	16
2.2.3 Mecanismos mediados por células T.....	17
2.3 Control y manipulación de la respuesta inmune.....	19
2.3.1 Características fenotípicas y funcionales de las células Th.....	19
2.3.2 Naturaleza de las señales de polarización hacia Th1 y Th2.....	21
3. ENFERMEDAD AUTOINMUNE.....	23
3.1 Lupus Eritematodo sistémico.....	23
3.1.1 Mecanismos patogénicos del LES.....	24
3.1.1.1 Autoanticuerpos e inmunocomplejos en el LES.....	24
3.1.1.2 Patrón de citoquinas en el LES.....	28
3.2 Artritis Reumatoide.....	29
3.2.1 Mecanismos patogénicos de la AR.....	30
3.2.1.1 Autoanticuerpos e inmunocomplejos en la AR.....	30

3.2.1.2 Infiltración celular en la AR	32
3.2.1.3 Patrón de Citoquinas en la AR.....	33
3.2.1.4 Activación de vías de transducción de señales y factores de transcripción en la AR	34
3.2.1.5 Terapia en la AR.....	35
4. MODELOS DE AUTOINMUNIDAD	36
4.1 Modelos animales de LES	37
4.2 Modelos animales de AR	38
5. ENFERMEDAD DEL INJERTO CONTRA EL HUÉSPED (EICH) COMO MODELO DE AUTOINMUNIDAD.....	40
5.1 Tipos de EICH	42
5.2 Ejemplos de modelos murinos de EICH.....	43
6. INTERLEUQUINA-12	47
6.1 Estructura de IL-12 y su receptor	47
6.2 Fuente celular y dianas de IL-12	49
6.3 Actividades Biológicas de la IL-12	51
6.3.1 Regulación de las respuestas Th1/Th2 mediante IL-12	51
6.3.2 Inducción de la secreción de citoquinas mediada por IL-12	52
6.3.3 Efectos de la IL-12 sobre respuestas mediadas por anticuerpos	53
6.3.4 Otras actividades de la IL-12	53
6.4 Efecto de la IL-12 sobre enfermedades infecciosas	54
6.5 Efecto de IL-12 sobre enfermedades autoinmunes	55
6.5.1 Efecto de la IL-12 sobre enfermedades autoinmunes Órgano-Específicas	55
6.5.2 Efecto de IL-12 sobre enfermedades autoinmunes Sistémicas.....	56
6.6 Efecto de IL-12 sobre la EICH.....	58
6.7 Efecto de IL-12 sobre el shock séptico	62
6.8 Efecto de IL-12 sobre tumores	62
6.9 Regulación de la producción y función de IL-12	63
OBJETIVOS.....	67

MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1. CEPAS DE RATONES.....	73
2. INDUCCIÓN DE EICH EN EL MODELO EXPERIMENTAL: BALB/C [BALB/C X A/J]F1 (CAF1).....	75
2.1 Obtención del injerto.....	75
2.2 Estudio de la viabilidad celular.....	77
3. TRATAMIENTO CON INTERLEUQUINAS.....	78
3.1 Tratamiento con rmIL-12.....	78
3.2 Tratamiento con rmIL-4.....	80
4. GRUPOS DE ESTUDIO.....	80
4.1 Modelos experimentales de EICH.....	80
4.2 Grupos control.....	81
5. ESTUDIOS CLÍNICOS.....	83
6. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	84
6.1 Obtención de tejidos.....	84
6.2 Tinción hematoxilina-eosina.....	85
6.3 Inmunofluorescencia directa.....	87
7. ESTUDIOS SEROLÓGICOS.....	88
7.1 Determinación de anticuerpos antinucleares (ANAs) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre tejidos de rata.....	88
7.1.1 Preparación de los tejidos.....	88
7.1.2 Técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre rata.....	89
7.2 Determinación de anticuerpos antifilagrina (AFA) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre esófago de rata.....	90
7.3 Determinación de anticuerpos antiribonucleoproteínas por inmunoprecipitación de ARNs.....	90
7.3.1 Preparación del cultivo celular.....	92
7.3.2 Marcaje metabólico de las células con ³² Pi.....	93
7.3.3 Preparación del extracto celular.....	94

7.3.4 Preparación de las muestras para IP.....	96
7.3.5 Extracción y estudio de los ácidos nucleicos precipitados.....	98
7.3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante para el análisis de los ácidos nucleicos.....	100
7.4 Técnicas de ezimoinmunoensayo	102
7.4.1 Determinación de anticuerpos anti-ADN de doble cadena (anti-ADNdc)	103
7.4.2 Determinación de anticuerpos anti-Histonas.....	105
7.4.3 Determinación de anticuerpos anti-FR	107
7.4.4 Determinación de anticuerpos anti-Glucosa-6-fosfato Isomerasa.....	108
7.4.5 Determinación de Igs en suero	109
8. ESTUDIOS CELULARES	112
8.1 Análisis fenotípico de las subpoblaciones y estudio de los niveles de quimerismo por citometría de flujo.....	112
8.2 Ensayos de citotoxicidad.....	116
8.2.1 Actividad citotóxica mediada por células T (CTL).....	116
8.2.2 Actividad Natural Killer (NK).....	118
8.3 Producción espontánea de interleuquinas en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos.....	119
9. ESTUDIOS MOLECULARES	120
9.1 Extracción de ARN	120
9.2 Ensayo de protección contra RNasas (RPA)	122
9.2.1 Síntesis de la sonda.....	123
9.2.2 Hibridación de la sonda con muestras de ARN.....	125
9.2.3 Tratamiento con RNasa.....	126
9.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.....	128
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	129

RESULTADOS.....	75
1. ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DE LA EICH.....	133
2. ESTUDIOS SEROLÓGICOS	140
2.1 Valoración de inmunoglobulinas	140
2.2 Autoanticuerpos.....	142
2.2.1 Anticuerpos antinucleares	142
2.2.2 Otros autoanticuerpos	144
3. PERFIL DE CITOQUINAS	148
3.1 Expresión de citoquinas.....	148
3.2 Producción espontánea de citoquinas.....	151
4. CITOTOXICIDAD.....	153
4.1 Actividad CTL.....	153
4.2 Actividad NK.....	154
5. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y ESTUDIO DE LOS NIVELES DE QUIMERISMO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	156
5.1 Análisis fenotípico del Bazo	156
5.2 Quimerismo parental en el bazo de ratones inducidos	160
5.3 Análisis fenotípico del timo	165
5.4 Quimerismo parental en el timo de ratones inducidos	167
DISCUSIÓN.....	169
CONCLUSIONES.....	185
BIBLIOGRAFÍA.....	189
ANEXO	219

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADNdc	ácido desoxirribonucleico de doble cadena
Ag	Antígeno
ALPS	Síndrome Linfoproliferativo Autoimmune Humano
ANAs	Anticuerpos anti nucleares
anti-Sm	Anticuerpo contra una proteína ribonuclear
APC	Célula Presentadora de Antígeno
AR	Artritis Reumatoide
ARN	Ácido Ribonucleico
CD-	Cluster de diferenciación
CD40L	CD40 Ligando
cEICH	Enfermedad del Injerto Contra el Huésped Crónica
CI	Complejos Inmunes
CIA	Artritis Inducida por Colágeno
CTL	Células citotóxicas
DC	Célula Dendrítica
DEPC	Dietil pirocarbonato
DR-	Alelo HLA
EAE	Encefalomiелitis Autoimmune Experimental
EICH	Enfermedad del Injerto contra el Huésped
FASL	FAS-Ligando
FR	Factor Reumatoide
GATA-3	Proteína 3 de unión GATA
gld	gen FAS ligando
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias Granulocitos-Macrófagos

GPI	Glucosa Fosfato Isomerasa
HLA	Complejo mayor de Histocompatibilidad Humano
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea
hsp	Proteínas de Choque Térmico
i.m	Intramuscular
i.p	Intraperitoneal
ICH	Injerto Contra el Huésped
IDDM	Diabetes Mellitus Dependiente de Insulina
IFN-	interferon gama
Ig	inmunoglobulina
IL-	Interleuquina-
IL-12p70	Heterodímero de IL-12
IL12R	Receptor de Interleuquina 12
IRBP	Proteína de Unión Interfotoreceptor Retinoide
JAKs	Quinasa Janus
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
Lpr	gen del infoproliferación (gen FAS)
MBP	Proteína de Unión a la Manosa
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MPS	Sistema Fagocítico Mononuclear
MRL	Cepa murina
NK	Natural Killer
NOD	Diabético No-Obeso
OVA	Ovoalbúmina
P35	Cadena Polipeptídica de 35 KDA de IL-12
p40	Cadena Polipeptídica de 40 KDA de IL-12
RA33	Antígeno Nuclear

rmIL-12	Interleuquina 12 Recombinante Murina
RNP	Ribonucleoproteína
RPA	Ensayo de protección contra Rnasas
STAT	Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción
t.a	Temperatura ambiente
T-bet	Regulador de la expresión de IL-12R inducido por STAT-1
TCR	Receptor de Células T
TGF-	Factor de Crecimiento Transformante
Th	Células T colaboradoras (T helper)
TNF-	Factor necrótico tumoral
TNP-KLH	Hemocianina limpet Keyhole-trinitrofenil

INTRODUCCIÓN

1. AUTOTOLERANCIA

Una de las propiedades fundamentales del sistema inmunitario es su capacidad para reconocer y responder frente a antígenos extraños, pero no frente a antígenos propios. Esta capacidad de tolerar lo propio, conocida como autotolerancia, se consigue mediante mecanismos que neutralizan física o funcionalmente las células potencialmente reactivas frente a los antígenos propios (linfocitos T o B autorreactivos).

Los tipos de mecanismos de tolerancia que se establecen vienen determinados por: 1) las características estructurales del antígeno; 2) la cantidad y la distribución de la expresión de un autoantígeno; 3) la afinidad con la que el receptor TCR reconoce los complejos péptido-MHC; 4) el estado de maduración inmunológica del individuo; 5) el estado de maduración de los linfocitos; 6) el lugar de encuentro Ag-linfocito; 7) el tipo de células presentadoras de Ag; 8) la producción de moléculas coestimuladoras y

citoquinas; y 9) una situación de peligro. (Klein and Kyewski, 2000; Miller, 2001).

1.1 MECANISMOS DE AUTOTOLERANCIA

Durante el proceso de maduración de las células T en el timo, los precursores expresan diversas moléculas de superficie y ordenan su ADN genómico para generar una gran variedad de receptores de células T (TCRs) capaces de reconocer cualquier agente extraño y las variaciones antigénicas que experimentan muchos microorganismos. Además del reconocimiento de agentes extraños la producción de diversidad también genera células T capaces de reconocer antígenos del propio organismo. Por esta razón el sistema inmunológico requiere de mecanismos de inducción de tolerancia.

Estos mecanismos de inducción de tolerancia actúan a nivel central (*Tolerancia Central*) y periférico (*Tolerancia Periférica*) y afectan tanto a los linfocitos T como B.

La tolerancia central se lleva a cabo en el timo e implica el encuentro y unión con cierto grado de afinidad de los TCRs expresados en células T inmaduras a complejos antígenos-MHC expresados en células epiteliales de la región cortical tímica. Una unión de baja afinidad selecciona de manera positiva células T que reconocen complejos MHC/péptidos propios. Por el contrario, la unión con alta afinidad selecciona de manera negativa las células T cuyos TCRs son capaces de reconocer estos complejos. (Miller, 2001).

Actualmente, el timo es considerado el lugar principal de inducción de tolerancia a una gran mayoría de proteínas específicas de tejido, sintetizadas por células epiteliales de la médula tímica y/o que alcanzan la médula a través de la sangre. Por el contrario, el establecimiento de la tolerancia frente a antígenos que no están expresados o no llegan al timo se consigue a través de mecanismos de tolerancia periféricos. (Miller, 2001).

Los principales mecanismos que mantienen la tolerancia frente a los antígenos propios son:

Delección clonal: Los linfocitos que expresan receptores de antígeno específicos de un antígeno propio, y se encuentran con el antígeno propio durante su desarrollo, son eliminados mediante muerte celular programada en los órganos linfoides primarios (las células T autorreactivas en el timo y las células B autorreactivas en la médula ósea).

Anergia clonal: Se caracteriza por la incapacidad de los linfocitos de proliferar en respuesta a un antígeno, la regulación a la baja del receptor antigénico y/o de los receptores de citoquinas y moléculas coestimuladoras, y la capacidad de revertir este estado de anergia al exponerse a estímulos adecuados.

Ignorancia clonal: Mecanismo mediante el cual algunos de los linfocitos autorreactivos que se encuentran con antígenos propios no se activan ni se vuelven tolerantes.

Supresión: Mecanismo/s que tiene/n lugar cuando el linfocito T o B reactivo contra un antígeno propio, no es eliminado y presenta capacidad de

responder contra él, pero no se activa (aún cuando se encuentre con el antígeno en condiciones adecuadas) porque es controlado por otras células T reguladoras/supresoras o factores que de ellas derivan. Las células T reguladoras forman parte del repertorio normal de células T y pueden ser generadas tanto en el timo como en la periferia (Seddon, 2000).

Hay evidencias que indican que las células T reguladoras juegan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia inmune a antígenos propios y extraños (Shevach, 2000; Zelenika y col., 2001; Chatenoud y col., 2001;).

Se han aislado varias subpoblaciones de linfocitos T a partir de órganos linfoides periféricos en ratones y humanos que tienen la habilidad de regular a la baja la proliferación de células efectoras (Roncarolo y col., 2001; Zhang y col., 2001; Levings y col., 2001). Las células T $CD4^+CD25^+$ son las células T reguladoras más extensamente estudiadas. La eliminación de estas células en ratones conduce al desarrollo de enfermedades autoinmunes sistémicas y su adición mejora los síntomas autoinmunes inducidos experimentalmente. (Sakaguchi y col., 1995). Otras células T reguladoras son las células $CD4^+CD45RB^{low}$, $CD4^+DX5^+$, $CD8^+$, α -TCR y las células T dobles negativas $CD4^-CD8^-$ (Saoudi y col., 1996; Chatenoud y col., 2001; Zeng y col., 2004), de manera que hay diferentes mecanismos responsables del efecto supresor.

Los mecanismos de supresión intervienen tanto en la inhibición de respuestas inmunológicas excesivas frente a antígenos extraños, como en la prevención de respuestas inmunes a antígenos propios por parte de células autorreactivas que se han escapado de otros mecanismos de control.

El mecanismo efector veto: forma parte de los mecanismos de supresión. Contribuye a la regulación de la respuesta inmune mediante la transmisión de una señal negativa a una célula autorreactiva por la célula que expresa el

autoantígeno. El receptor de la célula autorreactiva, a menudo un linfocito T precursor citotóxico, proporciona la especificidad del sistema. (Miller and Lim, 1986).

Red Idiotipo-anti-Idiotipo: Es otro sistema de regulación del repertorio linfocitario, que consiste en el reconocimiento específico por parte de los receptores de una clona de linfocitos de las regiones variables de los receptores de otros linfocitos. Estas regiones de los receptores que son las que reconocen los antígenos y que permiten diferenciar cada clona de linfocitos, se denominan idiotipos. Las respuestas inmunes específicas para los idiotipos son anti-idiotípicas. Si una clona se expande durante una respuesta inmunológica frente a un antígeno, otros linfocitos podrían específicamente reconocer y responder contra las regiones variables de los receptores para el antígeno en la clona estimulada. Idiotipo y anti-idiotipo constituyen un sistema de autorregulación al poder aumentar o inhibir la activación de los linfocitos con un determinado idiotipo (Jerne, 1974).

La inmunidad frente a antígenos propios forma parte de esta red dinámica conocida como red autoinmune al poder proporcionar anticuerpos frente a otros anticuerpos o frente a regiones V de los TCR autorreactivos.

2. AUTOINMUNIDAD

El fracaso o ruptura de los mecanismos normalmente responsables del mantenimiento de la autotolerancia da lugar a reacciones inmunitarias contra antígenos autólogos. Estas reacciones se denominan reacciones

autoinmunes, y las enfermedades que producen se llaman enfermedades autoinmunes.

Existe pero, un cierto grado de respuesta frente a antígenos propios que podemos considerar no patológica, y que se conoce como autoinmunidad natural. A lo largo de los años se ha demostrado la presencia de linfocitos T y B autorreactivos en individuos sanos, lo que refuerza el concepto de autorreactividad natural como una propiedad inherente al sistema inmune. (Nobrega y col., 2002).

Los criterios necesarios para considerar que se ha producido una enfermedad autoinmune son: (a) la presencia de autoanticuerpos contra antígenos propios; (b) la expresión clínica del fenómeno autoinmune (la aparición de daño tisular causado por la respuesta autoinmune contra los autoantígenos); (c) la presencia de infiltrados linfocitarios en los tejidos afectados; (d) la existencia de modelos experimentales espontáneos o inducidos que remedan a los del hombre y en los que se demuestra que el sistema inmune juega un papel; y (e) la existencia de memoria autoinmune.

2.1 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL DESARROLLO DE UNA ENFERMEDAD AUTOINMUNE

En la actualidad seguimos sin conocer exactamente para ninguna de las enfermedades autoinmunes, cual es el mecanismo etiológico que las produce, ni los mecanismos íntimos de su desarrollo fisiopatológico. Sin embargo, podemos decir que las enfermedades autoinmunes presentan una etiología poligénica y multifactorial.

Los múltiples factores que preceden a una enfermedad autoinmune y predisponen a ella, pueden actuar simultáneamente y ser operativos en diferentes desórdenes autoinmunes. Sus distintas combinaciones generan un heterogéneo repertorio de enfermedades autoinmunes.

2.1.1 Factores genéticos

La participación de factores genéticos en el desarrollo de enfermedades autoinmunes se basa en evidencias obtenidas de estudios de familias, estudios de gemelos y estudios de poblaciones. En efecto, desde los primeros estudios de pacientes con enfermedades autoinmunes se conoce que estas enfermedades aparecen con un patrón familiar, y que existe un elevado nivel de concordancia entre gemelos monozigóticos. Por ejemplo, la concordancia para la artritis reumatoide entre gemelos monozigóticos es del 12-15% mientras que entre dizigóticos es del 2-4% (Jirholt y col., 2001). Los estudios de poblaciones han mostrado también la existencia de diferencias importantes en la prevalencia de algunas enfermedades autoinmune entre diferentes razas y etnias, por ejemplo la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico. (Silman and Pearson, 2002).

Hasta la fecha se han conseguido implicar una serie de genes en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, entre los cuales cabe mencionar los siguientes:

Genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA): La correlación de los genes de HLA con las enfermedades autoinmunes ha sido de las más

estudiadas debido al papel crítico de estos genes en la maduración de las células T y en la inducción de respuestas inmunes en contra de antígenos propios. La asociación más frecuente se encuentra entre la espondilitis anquilosante y el HLA-B27, presente en un 96% de los pacientes. La relación entre la AR y el HLA es el mejor vínculo genético en dicha enfermedad y ha sido localizado principalmente en la tercera región hipervariable de las cadenas DR especialmente entre los aminoácidos 70-74. El epítipo susceptible es el QKRAA o QRRAA. Esta secuencia se encuentra en los genes DR asociados a la AR, que incluyen DR4, DR14 y DR1 (por ejemplo DRB* 0401, DRB* 0404, DRB* 0101 y DRB* 1402). El epítipo susceptible puede también influir en la severidad de la enfermedad. El HLA-DR4 (específicamente los alelos DR-0404 y DR-0414), así como DR1 y DR10 en diferentes poblaciones, se encuentran con una frecuencia del 80-90% en los pacientes con artritis reumatoide. Se ha demostrado que el grado de asociación entre ciertos alelos del HLA y la AR depende de la población seleccionada de pacientes con esta enfermedad. De modo, que la asociación con ciertos alelos del HLA-DR4 en estudios de la población blanca procedentes de EEUU o Europa Occidental, pero con otros alelos en poblaciones japonesas o judías indican claramente que otros genes interaccionan con los genes HLA en la susceptibilidad a padecer AR (Klareskog y col., 2002). Asociaciones menos significativas correlacionan el LES con los alelos DR2 y DR3, y, la polimiositis y el síndrome de Sjögren primario con DR3. (Feldmann, 2001; Reveille y col., 2001; Heldt y col., 2003).

Genes del receptor de las células T (TCR): En algunas patologías como la artritis reumatoide, se han hecho estudios que sugieren una asociación entre determinados genes del TCR con la enfermedad. En 1995 se demostró la asociación con el gen TCR Vb 12.2 en un estudio de 28 familias con 79

afectados (McDermott y col., 1995; Jirholt y col., 2001). Otro estudio demostró la asociación entre el gen TCR Va8 pero no TCR Vb en 766 pacientes con AR (Cornelis y col., 1997; Jirholt y col., 2001). Sin embargo, en un estudio realizado en el Reino Unido donde se analizaron 184 familias con 404 afectados de AR se descarta la incidencia de los loci TCR y TCR como locis de susceptibilidad a padecer la enfermedad (Hall y col., 1997; Jirholt y col., 2001). De acuerdo con este resultado negativo, los análisis de ligamiento realizados en animales no proporcionan evidencias de la posible influencia de los genes del TCR. (Jirholt y col., 2001).

Genes implicados en la apoptosis: La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada en la que se produce la ruptura de la cromatina nuclear por una endonucleasa. Mantiene la homeostasis de los linfocitos periféricos y minimiza la acumulación de linfocitos autorreactivos. La ruptura de los mecanismos de control de la apoptosis se ha relacionado con la aparición de linfadenopatía, ruptura de la tolerancia periférica y desarrollo de enfermedades autoinmunes.

La mutación espontánea, *lpr*, en el gen responsable de la producción de moléculas FAS (CD25), mediadoras de apoptosis, es una mutación de carácter recesivo que provoca en ratones enfermedad autoinmune sistémica concurrente con acumulación de células T maduras doble negativas en periferia incapaces de regular las células T autorreactivas con defecto en la expresión del gen FAS (Watanabe-Fukunaga y col., 1992; Watanabe y col., 1995; Ford y col., 2002). Se ha sugerido que el desarrollo de la enfermedad podría estar causada por la presencia de células T autorreactivas en periferia, resultantes de una selección negativa incompleta en el timo o de una delección periférica imperfecta. (Matsumoto y col., 1991; Adachi y col.,

1996; Ford y col., 2002). La mutación *gld* (mutación en el gen Fas-Ligando), fue descrita como un síndrome linfoproliferativo de carácter general con presencia de autoanticuerpos en el suero de estos ratones (Roths y col., 1984). Ambas mutaciones han sido también descritas en humanos con idénticas consecuencias. El déficit de Fas provoca el llamado ALPS (síndrome linfoproliferativo autoinmune humano) (Puck and Sneller, 1997) y el déficit de Fas-Ligando se ha encontrado asociado a enfermedad linfoproliferativa y LES (Wu y col., 1996). Estos datos sugieren que estas mutaciones conducen a la ruptura de la tolerancia en periferia.

Genes del sistema del complemento: La deficiencia de diferentes componentes de la cascada del complemento se ha asociado principalmente al LES, por ejemplo, deficiencias en *C1q*, *C1r*, *C1s*, *C2*, *C4* (*C4A0* y *CaBo*) y *C3*. También se ha asociado al LES la deficiencia de una proteína de unión a la manosa (MBP) relacionada con el sistema del complemento (Walport and Lachmann, 1990).

Genes asociados a citoquinas: Las citoquinas son componentes esenciales de la respuesta inmune, y un desequilibrio en la producción neta de citoquinas juega un importante papel en la iniciación y perpetuación de enfermedades autoinmunes (Kuchroo y col., 2002; Adorini, 2003). Estudios basados en modelos animales sugieren que las citoquinas de tipo Th1 promueven el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes, como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), la artritis reumatoide inducida por colágeno tipo II (CIA), mientras que un patrón de citoquinas tipo Th2 puede atenuar estas enfermedades (Isomaki y col., 1999; Adorini, 2003). El bloqueo o neutralización de citoquinas de tipo Th1 o la inducción de una

inversión en el balance Th1>Th2 o Th1<Th2 puede influir en el desarrollo de esta enfermedad autoinmune. Por ejemplo, la neutralización endógena de IL-12 mediante anticuerpos monoclonales contra la citoquina o mediante antagonistas de IL-12R previene el desarrollo de IDDM, EAE. Del mismo modo, la administración de anti-TNF- en un modelo de artritis inducida por colágeno tipo II, incluso después del inicio de la enfermedad, reduce significativamente la inflamación y la destrucción del tejido (Adorini, 2003). Mientras que, la administración de IL-4 a ratones NOD inhibe el desarrollo de IDDM. (Mueller y col., 1996; Adorini, 2003).

Genes asociados a quimioquinas: Las quimioquinas y sus siete receptores con dominio transmembrana acoplados a la proteína G, son un tipo de citoquinas con función quimiotáctica (de ahí su nombre), que tienen un papel crítico como iniciadoras y promotoras de las reacciones inflamatorias, ya que regulan el tráfico y afluencia al sitio de la inflamación de varios tipos celulares leucocitarios (eosinófilos, linfocitos T y B, monocitos y macrófagos, células dendríticas y neutrófilos). Está demostrado que las células T expresan distintos perfiles de quimioquinas después de la polarización hacia una u otra subpoblación Th y está modulado por citoquinas (Sallusto y col., 1998). La expresión de CCR3, CCR4 y CCR8 está asociada con la diferenciación *in vitro* de células T tipo Th2 (Bonecchi y col., 1998), mientras que el receptor de quimioquina CXCR3 y CCR5 están preferentemente expresados sobre células Th1 humanas. Y las quimioquinas CXCR4 y CCR2 se expresan por igual en ambas subpoblaciones Th1 y Th2. (Bonecchi y col., 1998; Loetscher y col., 1998). Estas observaciones sugieren que la expresión diferencial de estas moléculas podría ser útil en la determinación de células T que son importantes en la patogénesis de la enfermedad. (Susan and Dunn, 2001). Un incremento en la expresión de

CCR5 y CXCR3 se ha observado en la artritis reumatoide juvenil junto a un aumento en la relación IFN- γ /IL-4, lo que ha sugerido que el fenotipo Th1 encontrado en las articulaciones inflamadas crónicamente refleja la especificidad del reclutamiento hacia dichas articulaciones inflamadas (Wedderburn y col., 2000; Susan and Dunn, 2001).

2.1.2 Factores ambientales

Los factores ambientales también son fundamentales para el desarrollo de enfermedades autoinmunes y pueden ser de diferentes tipos:

Agentes infecciosos: Las infecciones virales y bacterianas preceden muy a menudo a una enfermedad autoinmune. Un microorganismo infeccioso puede contribuir a la inducción de autoinmunidad por lo menos de dos maneras. La primera, generando una señal específica de antígeno mediante lo que se conoce como mimetismo molecular (determinantes antigénicos del agente infeccioso simulan estructuras de los tejidos del huésped de tal manera que se inducen respuestas inmunes de reacción cruzada contra antígenos propios) o a través de la liberación de cantidades excesivas de antígenos propios del tejido del huésped durante el proceso infeccioso. La segunda, generando señales no específicas de antígeno que potencian las respuestas inmunes a través de lo que se conoce como efecto adyuvante. (Rose, 2001; Wraith y col., 2003).

Entre las proteínas implicadas en mecanismos de mimetismo molecular, se encuentran las proteínas del choque térmico (hsp). En un modelo experimental de artritis reumatoide en ratas inmunizadas con

microbacterias inactivadas por el calor y acompañadas de adyuvante de Freund, van Eden y colaboradores demostraron que el epítipo bacteriano reconocido por la célula T era un nonapéptido de la hsp de 65 Kda (van Eden y col., 1988). Se ha descrito también que hsp homólogas pueden desarrollar papeles importantes en enfermedades tan diferentes como la artritis y la diabetes (Elias y col., 1990), sugiriendo así que la exposición a las proteínas del agente infeccioso son capaces de iniciar la respuesta inmune que posteriormente se dirigirá contra aquellas hsp homólogas que comparten estructuras con los microorganismos.

Por otro lado, una infección viral que actúe a nivel del sistema inmune, puede destruir o inactivar poblaciones celulares involucradas en el control de la respuesta inmune, y provocar la ruptura de la tolerancia (McChesney y col., 1997).

Factores hormonales: Ya en 1979 Sakane y colaboradores demostraron en modelos murinos experimentales la importancia de los estrógenos en el desarrollo del LES (Sakane y col., 1979). Además, en la patología humana en casi todas las enfermedades autoinmunes las mujeres están más afectadas que los hombres. Concretamente en el caso de la cirrosis biliar primaria y la tiroiditis de Hashimoto la relación mujeres:hombres llega a ser de 50:1, en otras como el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico y la enfermedad de Graves la proporción es de 9:1, mientras que en la diabetes mellitus tipo I y en la artritis reumatoide la relación es de 4:1 y 3:1, respectivamente.

Fármacos: Se ha demostrado que algunos fármacos pueden estar implicados entre los factores que pueden iniciar una enfermedad

autoinmune. Así, pacientes que tomaban determinados medicamentos como: procainamida, hidralazina y metildopa, desarrollaban enfermedades autoinmunes compatibles con lupus (característicamente con autoanticuerpos anti-histonas subtipo H2A-H2B); en un 20% de pacientes tratados con halotano (anestésico muy común), este tratamiento se ha asociado con una forma suave de afectación hepática, que en algunos casos puede derivar en una forma de hepatitis severa. Como posible mecanismo patogénico, se considera que el citocromo P450 metaboliza el halotano dando lugar a una serie de metabolitos reactivos capaces de unirse con proteínas del hígado, actuando de neoantígenos y provocando una respuesta autoinmune (Manns and Obermayer-Straub, 1997).

2.2 MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La clasificación más frecuentemente utilizada de las enfermedades autoinmunes se basa en el conocimiento del principal mecanismo patogénico responsable de la lesión celular y tisular, característico de este tipo de enfermedades. Básicamente se pueden agrupar en tres los mecanismos inmunopatogénicos implicados (Tabla 1):

- 1) Mecanismos mediados por anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie.
- 2) Mecanismos mediados por inmunocomplejos.
- 3) Mecanismos mediados por células T.

Tabla 1

Síndrome	Autoantígeno	Consecuencia
<i>Mecanismos mediados por Acs dirigidos contra Acs de superficie</i>		
Anemia hemolítica autoinmune	Grupo Rh	Dstrucción de los hematíes por el complemento y fagocitosis, anemia.
Púrpura Trombocitopenica autoinmune	Integrina de plaquetas GpIIb:IIIa	Sangrado anormal
Síndrome de Goodpasture	Colágeno tipo IV	Vasculitis, afectación renal, hemorragia pulmonar.
Penfigus vulgaris	Caderina epidermal	Piel ampollosa
Fiebre reumática aguda	Antígenos de la pared celular streptococal, Acs cross-reacciona contra músculo cardíaco	Artritis, Miocarditis, válvulas del corazón cicatrizan tarde.
<i>Mecanismos mediados por inmunocomplejos</i>		
Endocarditis bacterial subaguda	Antígeno bacteriano	glomerulonefritis
Crioglobulinemia esencial mixta	Complejos factor reumatoide IgG	Vasculitis sistémica
Lupus eritematoso sistémico	ADN, histonas, ribosomas, snRNP, scRNP	Glomerulonefritis, vasculitis, artritis
<i>Mecanismos mediados por células T</i>		
Diabetes mellitus insulina-dependiente	Antígeno célula pancreática	Dstrucción célula pancreática
Artritis reumatoide	Antígeno en la sinovia articular desconocido	Inflamación y destrucción articular
Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), Esclerosis múltiple	Proteína básica de la mielina, Proteína proteolípida	Invasión cerebral por céls. T CD4 ⁺ , parálisis

2.2.1 Mecanismos mediados por anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie

La unión de anticuerpos específicos a antígenos celulares y tisulares puede dañar ese tipo de célula o tejido. Estos anticuerpos son generalmente de la clase IgG o IgM y producen enfermedad activando *in situ* los mismos mecanismos efectores que tienen lugar en las respuestas inmunitarias normales: el complemento, la fagocitosis y el reclutamiento de células inflamatorias. Algunos ejemplos lo constituyen la anemia hemolítica autoinmune, la púrpura trombocitopenia autoinmune, el síndrome de Goodpasture, el penfigus vulgaris y la fiebre reumática aguda (ver Tabla 1).

Sin embargo, en la mayoría de las enfermedades inducidas por autoanticuerpos, no se conocen los mecanismos responsables de la producción de los mismos.

2.2.2 Mecanismos mediados por inmunocomplejos

Los inmunocomplejos son compuestos de antígeno soluble y anticuerpo/s específico/s, que se forman en la circulación y se pueden depositar en la pared de los vasos sanguíneos prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Esto conduce a la activación local de leucocitos y del sistema del complemento, con la consiguiente lesión tisular.

Los inmunocomplejos se producen durante muchas respuestas inmunitarias, pero tienen significado patológico sólo si la cantidad,

estructura o mecanismos de aclaramiento de los mismos son tales que originan el depósito de grandes cantidades en los tejidos.

Los antígenos que inducen respuestas inmunitarias humorales patogénicas pueden ser antígenos extraños o propios, y los anticuerpos son generalmente de la clase IgM o IgG porque estos isotipos activan más eficazmente al complemento y/o a las células inflamatorias.

Las características anatomopatológicas de las enfermedades producidas por este tipo de mecanismo inmunopatológico reflejan donde se depositan los inmunocomplejos y no están determinadas por el origen celular del antígeno. Por lo tanto, las enfermedades mediadas por inmunocomplejos tienden a ser sistémicas, con poca o ninguna especificidad por un determinado tejido u órgano. Cuando los inmunocomplejos no son aclarados por el hígado y se depositan en el riñón, pueden causar una glomerulonefritis. (Ravetch and Clynes, 1998).

2.2.3 Mecanismos mediados por células T

Las células T que producen lesión tisular pueden ser autorreactivas o pueden ser específicas de antígenos proteicos extraños que estén presentes en, o se unan a, las células o tejidos propios.

Las lesiones anatomopatológicas varían dependiendo de los tipos de células T que producen estas lesiones. Las células T lesionan los tejidos por los mismos mecanismos responsables de la inmunidad celular contra los microorganismos:

- 1.- La activación de macrófagos por citoquinas secretadas tanto por las células T CD4⁺ de la subpoblación Th1 como por las células TCD8⁺.
- 2.- La lisis directa por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, de células diana que expresan antígenos extraños asociados al MHC-I.
- 3.- Lisis por apoptosis mediada por células T CD4⁺ de la subpoblación Th1.

Básicamente existen dos vías independientes de lisis que median la citotoxicidad por células T:

A) Lisis mediada por la exocitosis de gránulos que contienen perforina: La célula efectora libera gránulos cargados de enzimas proteolíticas (perforinas y granzimas o fragmentinas) al medio después de reconocer al antígeno específico sobre la célula diana.

B) Lisis mediada por la interacción de moléculas FAS con su ligando FASL unido a membrana o liberado de forma soluble.

2.3 CONTROL Y MANIPULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Una aproximación terapéutica efectiva para el tratamiento de las enfermedades inmunológicas se basa en la alteración del balance entre los niveles de citoquinas Th1 y Th2 producidas por las subpoblaciones de células T CD4⁺, Th1 o células inflamatorias, y Th2 o células colaboradoras, respectivamente. Ambos tipos celulares ejercen funciones muy diferentes. (Druet y col., 1995; Isomaki y col., 1999; Okubo y col., 1999; Adorini, 2003).

2.3.1 Características fenotípicas y funcionales de las células Th

Cuando células Th vírgenes se activan, la principal citoquina que producen es la IL-2. Puesto que también, durante la activación, las células Th presentan en superficie el receptor para la IL-2, esta citoquina actúa como factor de crecimiento de las propias células Th que la producen. Como resultado de esta estimulación autocrina, las células Th recientemente activadas proliferan para incrementar el número de células específicas de antígeno. Una vez han proliferado hasta formar un clon, este puede ser reestimulado por una APC, y empezar a secretar otras citoquinas como por ejemplo, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 y TNF- α . (Swain, 1999). Generalmente, un único clon de células Th no secreta todas estas citoquinas diferentes. En realidad, los clones de células Th tienden a secretar subgrupos de todas las citoquinas posibles. Existen al menos tres tipos de células Th CD4⁺ definidas por el patrón de citoquinas que producen y su asociación con uno u otro tipo de respuesta inmune celular y humoral: las células Th1, Th2 y Th0. (Isomaki y col., 1999; Mullen y col., 2001).

Las células Th1 producen principalmente IL-2, TNF- α e IFN- γ . La IL-2, como se menciona anteriormente, es un factor de crecimiento que estimula células CTLs y NK a proliferar. El TNF- α activa células NK además de macrófagos. El IFN- γ es una citoquina que activa macrófagos, y da señal a las células B, durante el cambio de clases de Igs, para que produzcan anticuerpos IgG2a e IgG3 que son buenos opsonizadores víricos y bacterianos y fijadores de complemento.

Por estas razones, es posible referirse a las células Th1 como células responsables de la respuesta inmune mediada por células, porque liberan citoquinas que instruyen al sistema innato y adaptativo a producir células y anticuerpos que son efectivos en este tipo de respuesta. (Mosmann and Coffman, 1989; Romagnani, 1995; Isomaki y col., 1999).

Las células Th2, secretoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, median el crecimiento, la diferenciación y la activación de mastocitos y eosinófilos, promueven la producción de anticuerpos no-citotóxicos, dirigen el cambio de Igs hacia los subtipos IgE, IgG1 e IgA, e inhiben la activación de los macrófagos. Por lo tanto, es apropiado referirse a las células Th2 como células responsables de la respuesta inmune de tipo humoral. (Mosmann and Coffman, 1989; Romagnani, 1995; Isomaki y col., 1999; Aarvak y col., 2000). La IL-13 también puede ser producida por poblaciones de linfocitos Th1, ya que se han detectado niveles altos de esta citoquina en el suero de pacientes con esclerosis sistémica (enfermedad Th1-dependiente). (Hasegawa y col., 1997; de Vries, 1998; Oriente y col., 2000).

En ausencia de señales claras que determinen una u otra subpoblación de células, la subpoblación de células Th CD4⁺ con un perfil de citoquinas

menos restringido que el de las células Th1 y Th2, las células Th0, media efectos intermedios que dependen de la proporción de citoquinas producidas y de la naturaleza de las células respondedoras. (Mosmann and Coffman, 1989; Romagnani, 1994). Las células Th0 probablemente representan una población heterogénea de células efectoras. El patrón de citoquinas de una célula Th0 puede permanecer no-definido o diferenciarse en Th1 o Th2 bajo la influencia de fuertes señales microambientales o debido a un background genético particular. (Seder and Paul, 1994).

2.3.2 Naturaleza de las señales de polarización hacia Th1 Y Th2

Estas dos subpoblaciones de células Th CD4⁺ no derivan de diferentes células T precursoras, sino que se ha demostrado que el desarrollo de un tipo u otro de célula refleja dos vías de diferenciación a partir de una única célula T pluripotente durante el período de activación. (Swain y col., 1990; Kamogawa y col., 1993; O'Garra and Murphy, 1994).

Ambos tipos de factores, genético y ambiental, están implicados en la diferenciación de células Th CD4⁺ hacia un fenotipo Th1 o Th2, aunque los mecanismos genéticos que controlan el tipo de diferenciación celular Th permanecen aún por esclarecer. Los factores ambientales están mejor definidos. (Murray y col., 1992; Hsieh y col., 1995).

Entre los factores ambientales a considerar cabe mencionar: 1) el tipo de APC: los macrófagos y las DC favorecen la diferenciación hacia Th1 y las células B hacia Th2; 2) las moléculas coestimuladoras presentes en APC: B7.1 promueve ambas respuestas Th1 y Th2, mientras que B7.2

favorece preferentemente la respuesta Th2 (Constant and Bottomly, 1997) y CD40L favorece las respuestas Th1; 3) la forma física del inmunógeno; 4) la dosis de antígeno: dosis bajas y medias de antígeno activan la respuesta Th1 en un modelo murino transgénico para el TCR mientras que dosis altas de antígeno o extremadamente bajas favorecen la desaparición de células productoras de IFN- γ y el desarrollo de células productoras de IL-4 en dicho modelo (Hosken y col., 1995); 5) la afinidad del antígeno al MHC, 6) el tipo de adyuvante. Como ejemplos, el adyuvante de Freund completo normalmente promueve el desarrollo de células Th1, mientras que la toxina de Bordetella pertussis y el aluminio promueven principalmente respuestas Th2; 7) las citoquinas liberadas por células APC y/u otro tipo celular en el momento que tiene lugar la presentación de antígeno, es el ejemplo más claro de factores que afectan las vías de diferenciación de células Th. Está generalmente aceptado que la presencia temprana de IL-12 o IL-4 es crítico en el desarrollo de Th vírgenes hacia los fenotipos Th1 y Th2, respectivamente (Seder and Paul, 1994). Se ha demostrado que la diferenciación hacia Th1 dirigida por IL-12 puede ser tanto dependiente como independiente de IFN- γ . No obstante, otras citoquinas como TNF- α y TGF- β pueden también contribuir al desarrollo de células Th1 (Wenner y col., 1996; O'Garra and Murphy, 1994).

Datos recientes sugieren que el proceso implicado en la decisión de uno u otro linaje celular empieza con la rápida activación de los genes para IFN- γ e IL-4. Entre 1-2h después de una estimulación antigénica y coestimulación de células Th, se detectan concentraciones elevadas de los ARN mensajeros para IFN- γ e IL-4 (Grogan y col., 2001). La activación inicial del gen para IL-4 parece depender de la expresión del factor de transcripción GATA-3, mientras que la activación inicial del gen para IFN- γ depende de la expresión de T-bet (Glimcher and Murphy, 2000). Seguido de estas

activaciones iniciales, la polarización hacia los fenotipos Th1 y Th2 requiere, además de la estimulación y coestimulación antigénica, señalización a través de los receptores de IL-12 e IL-4, respectivamente. La señalización vía IL-12 conduce a una activación de STAT4 que favorece la expresión de IFN- pero no la de IL-4, mientras que la señalización vía IL-4 conduce a una activación de STAT6 que favorece la expresión de IL-4 pero no la de IFN- . Así pues, se necesita la señalización vía moléculas TCR, moléculas coestimuladoras, y diferentes receptores de citoquinas durante la polarización hacia uno u otro fenotipo de célula Th, Th1 o Th2. (Grogan y col., 2001; Farrar y col., 2002; Smale and Fisher, 2002).

3. ENFERMEDAD AUTOINMUNE

3.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, multisistémica (puede afectar muchos sistemas de órganos incluyendo la piel, articulaciones y órganos internos), de gran heterogeneidad (los síntomas varían ampliamente con el individuo y se caracterizan por períodos de remisiones y exacerbaciones de los mismos) y variabilidad (el curso de la enfermedad puede variar desde una enfermedad episódica leve hasta una enfermedad severa y mortal), caracterizada por la producción de autoanticuerpos, así como la formación y depósito de complejos inmunes. Aunque no todas las manifestaciones del LES pueden ser atribuidas a los complejos inmunes, ellos juegan un papel muy importante en su patología e inmunopatología, siendo el LES el prototipo de la enfermedad mediada por

complejos antígeno-anticuerpo en el ser humano. La etiología de la enfermedad permanece desconocida pero se cree que es multifactorial, resultando de la interacción compleja de factores genéticos y ambientales. (Mok and Lau, 2003).

La prevalencia del LES es de 1 en 2000 habitantes, con una concordancia en gemelos fraternos de 2 a 5% mientras que en gemelos idénticos la concordancia llega a ser del 24 al 58% (Arnett y col., 1997). La enfermedad afecta 9 veces más a la mujer que al hombre y puede presentarse a cualquier edad, pero aparece con mayor frecuencia en personas cuyas edades están comprendidas entre los 10 y 50 años. (Mok and Lau, 2003).

3.1.1 Mecanismos patogénicos del LES

3.1.1.1 Autoanticuerpos e inmunocomplejos en el LES

El mecanismo responsable para la ruptura de la tolerancia en el LES aún permanece desconocido, sin embargo en los últimos años ha existido un progreso significativo en el conocimiento de las interacciones moleculares regulando la expansión de las células B y T autorreactivas.

La mayoría de personas normales tienen anticuerpos del tipo IgM en su suero contra el ADN de cadena sencilla. Estos anticuerpos corresponden al repertorio de autoanticuerpos naturales, tienen baja afinidad por el ADN y por otros autoantígenos tales como la tiroglobulina (Pisetsky y col., 1990). Por otra parte los anticuerpos contra el ADN de doble cadena son menos prevalentes en sujetos normales y contienen subgrupos de alta afinidad con

reactividad cruzada estrecha (Diamond y col., 1992). Otras características adicionales que contribuyen a la patogenicidad de los autoanticuerpos incluyen: La capacidad de fijar complemento, la afinidad por el ADN y otros antígenos que reaccionan cruzadamente, la carga de la molécula de anticuerpo o del complejo inmune que lo contiene y la secuencia de los aminoácidos de la proteína asociada (Rothfield, 1967; Mohan and Datta, 1995; Winfield, 1997).

El proceso mediante el cual la respuesta de los linfocitos T y B a un antígeno se expande para incluir la reactividad a antígenos adicionales depende de la degeneración del receptor de antígeno de la célula T de manera tal que un solo receptor se une a un complejo péptido-HLA; por lo tanto una célula T o B activada por un solo antígeno responde a múltiples autoantígenos y también a antígenos extraños (Neu y col., 1997). A través de este mecanismo, múltiples exposiciones a antígenos bacterianos, virales o químicos o autoantígenos puede llevar a la formación de anticuerpos contra el ADN.

Normalmente, los complejos inmunes Ag-Ac son eficientemente removidos de la circulación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS: mononuclear phagocyte system), que se encuentra principalmente en el hígado y el bazo. EL MPS es dependiente de los receptores para el complemento, de los receptores para reconocer la porción Fc de la inmunoglobulina (Ig) o Receptores Fc (FcR) y de los transportadores de Igs (Ravetch and Clynes, 1998). Un procesamiento anormal de los complejos inmunes puede estar jugando un papel importante en la patogénesis del LES por diferentes vías, incluyendo anomalías en los mecanismos de transporte o presentación, defectos en la función del MPS (Haakenstad and Mannik, 1974) o anomalías intrínsecas a la función fagocítica celular,

los cuales han sido descritos como factores importantes en la fisiopatogénesis del LES (Davies y col., 1992).

La fijación del complemento es esencial para el daño tisular lo cual coincide con la riqueza en anticuerpos patogénicos del tipo IgG1 e IgG3 que fijan complemento eficientemente (Rothfield and Stollar, 1967; Mohan and Datta, 1995). Por otra parte, la carga catiónica también da al anticuerpo una ventaja patogénica permitiendo que este se una a moléculas cargadas negativamente en la membrana basal glomerular (Suzuki y col., 1993).

Los complejos inmunes que son capaces de ligar el complemento de una forma eficiente, son fijados rápidamente por los eritrocitos, que tiene lugar a través del receptor eritrocitario para el complemento tipo 1 o CR1, con lo cual estos complejos de eritrocito-CI son presumiblemente incapaces de depositarse en los tejidos (Kimberly y col., 1987) y son transportados hacia el MPS fijo, donde son eliminados de la circulación (Cornacoff y col., 1983).

En cualquier situación en la que se disminuya la reacción de adherencia inmune eritrocito-CI, estará asociada a una mayor probabilidad de depósito de CI en los tejidos (Schifferli y col., 1986). El depósito en los tejidos de estos complejos circulantes Ag-Ac produce liberación de mediadores inflamatorios e infiltración con células inflamatorias, con el subsecuente daño tisular, lo cual se hace evidente especialmente en el riñón. Allí, estos depósitos se encuentran principalmente en la membrana basal glomerular, pero también se pueden depositar en cualquier otro órgano (Wener y col., 1987).

Siendo el Lupus una enfermedad multisistémica, parece lógico suponer que para cada órgano afectado e incluso para los diferentes compromisos en un mismo órgano existen diferentes mecanismos que

expliquen la vía final común de las lesiones. El principal órgano estudiado es el riñón y en él se han podido documentar varios mecanismos patogénicos.

Algunos anticuerpos anti-ADN de doble cadena causan glomerulonefritis al formar complejos con ADN que son atrapados pasivamente en el glomérulo mientras que otros causan la lesión al unirse directamente a las estructuras glomerulares lo cual puede demostrarse al obtener estos anticuerpos de los tejidos enfermos (Winfield, 1997). También se ha podido demostrar *in vitro* que el suero de pacientes con LES contienen inmunoglobulinas que se unen a extractos de la membrana basal glomerular (Lefkowitz y col., 1996) lo cual puede ser inhibido al tratar los extractos con ADNasa, sugiriendo que los anticuerpos contra el ADN causan nefritis por la unión al ADN de los componentes del glomérulo.

Las diferentes clases y subclases de Igs tienen también diferentes propiedades biológicas en los humanos. Tanto la subclase IgG1, así como la IgG3, fijan y activan el complemento de una manera eficiente (Augener y col., 1971), sin embargo, la subclase IgG2 es incapaz de activar el complemento eficientemente y por necesidad, el Fc R es esencial para el procesamiento y aclaramiento de los CI de IgG2. Así, en los pacientes con nefritis lúpica, se han descrito marcados defectos en la fagocitosis mediada por el Fc R (Clark y col., 1991; Salmon y col., 1992).

Algunos anticuerpos contra el ADN de pacientes con LES se unen a la membrana de células vivas, la penetran probablemente a través de la membrana de miosina y se unen a estructuras citoplasmáticas y celulares. (Alarcon-Segovia and Llorente, 1983; Yanase y col., 1997). Por otra parte los anticuerpos contra el ADN también tienen la capacidad de unirse a antígenos adicionales en la membrana basal glomerular o a componentes del

glomérulo o la pared de los vasos (C1q, nucleosomas unidos al colágeno tipo IV, laminina etc.) (Brinkman y col., 1990; Lefkowitz y col., 1996).

3.1.1.2 Patrón de citoquinas en el LES

Se ha demostrado que la inducción y progresión de la enfermedad del LES experimental murina se asocia a un desbalance y a un cambio en el perfil de citoquinas durante el curso de la enfermedad (Segal y col., 1997; Segal y col., 2003). De manera que, estos ratones primero producen niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 y TNF- α , que persisten durante el curso de la enfermedad, y elevados niveles de IL-2 y IFN- γ , que disminuyen significativamente con la evolución de la misma. Y en una etapa más tardía de la enfermedad, cuando las manifestaciones clínicas del LES están presentes, producen un incremento considerable en los niveles de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-10). Estos cambios en el perfil de las citoquinas, primero derivadas de células Th1 (IFN- γ , IL-2) y posteriormente de células Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) se han observado también en el suero de pacientes humanos con la enfermedad (Tokano y col., 1999).

En el LES se ha demostrado la existencia de células T y B activadas. Se ha sugerido que variaciones en la producción de citoquinas pueden estar relacionadas con esta activación de células T y B observada en la enfermedad. Sin embargo, el mecanismo responsable queda aún por esclarecer. Generalmente, se piensa que ambos tipos de citoquinas Th1 y Th2 estarían reguladas por otros factores, como por ejemplo, moléculas de superficie celular, citoquinas características o dosis de antígenos, señal de transducción, hormonas o sistema nervioso y factores genéticos.

3.2 ARTRITIS REUMATOIDE

Entre las diferentes formas existentes de enfermedad reumática la más discapacitante es la artritis reumatoide (AR). La AR es una enfermedad de etiología desconocida, pero con alteraciones de base autoinmune. Se caracteriza principalmente por una inflamación y proliferación de la membrana sinovial de las articulaciones, con tendencia a la destrucción y deformación del cartílago y el hueso, y con la consiguiente pérdida de la capacidad funcional. La AR es una enfermedad sistémica que comparte rasgos con otras enfermedades vasculares del colágeno, como el síndrome de Sjögren, el LES y la esclerodermia. (Feldmann, 2001).

La AR es la enfermedad autoinmune más frecuente, ya que presenta una prevalencia entre el 0.5% y 1% en la mayoría de poblaciones. Como en muchas otras enfermedades autoinmunes aparece con mayor frecuencia entre las mujeres (proporción 3:1 respecto de los hombres). El comienzo de esta enfermedad puede darse en cualquier época de la vida, aunque la máxima incidencia se sitúa entre los 30 y 60 años. Existe un subtipo de artritis crónica análoga a la AR del adulto y que constituye un 12% de la denominada artritis crónica juvenil, entidad diferenciada de la AR y que afecta principalmente a niños y adolescentes. (Riise y col., 2000; Carmona y col., 2002; Firestein, 2003).

3.2.1 Mecanismos patogénicos de la AR

3.2.1.1 Autoanticuerpos e inmunocomplejos en la AR

Las primeras teorías sobre los mecanismos patogénicos en la artritis reumatoide atribuyen un papel en el desarrollo de la enfermedad a las reacciones inmunológicas anormales que se desarrollan en los tejidos sinoviales. Estas teorías sostienen que el mecanismo patogénico principal responsable de la lesión celular y tisular que caracteriza la AR está mediado por la presencia de autoanticuerpos e inmunocomplejos. Concretamente, los inmunocomplejos estarían formados por factores reumatoides y otros autoanticuerpos, que fijarían complemento y liberarían factores quimiotácticos, como el C5a, con el subsiguiente reclutamiento de células inflamatorias hacia la articulación reumática, donde se activarían contribuyendo a la destrucción local (Firestein, 2003). Dado que este mecanismo patogénico no era exclusivo de la AR y en otras enfermedades inflamatorias crónicas también se producían factores reumatoides, estas teorías pasaron a considerarse un epifenómeno (fenómeno secundario) en la AR. No obstante, volvieron a reconsiderarse tras el descubrimiento reciente de un modelo murino de artritis espontánea con producción de anticuerpos dirigidos contra un antígeno de expresión ubicua, la glucosa-6-fosfoisomerasa (GPI) (Matsumoto y col., 1999), (McDevitt, 2000; Schaller y col., 2001; Firestein, 2003). La artritis que desarrollaba este modelo murino de enfermedad (Matsumoto y col., 1999; Schaller y col., 2001) podía ser transferida mediante el suero de ratones afectados. Sin embargo, aunque Ac anti-GPI estaban presentes en muchos pacientes con AR no eran específicos de esta enfermedad. La habilidad de antígenos ubicuos como la GPI para inducir inflamación de la sinovia estaría probablemente relacionada

con su adherencia a las superficies del cartílago. La presentación de los complejos antígeno-anticuerpo sobre el cartílago proporcionaría un sustrato excepcionalmente bueno para la fijación del complemento, similar al factor reumatoide que se encuentra sobre el cartílago de pacientes con AR. Una situación similar tiene lugar en la artritis murina inducida mediante colágeno. En este caso los anticuerpos anti-colágeno tipo II se unen al colágeno del cartílago articular.(Firestein, 2003).

Están actualmente considerados como antígenos artritogénicos en la AR, moléculas expresadas específicamente en las articulaciones, como son el factor reumatoide, el colágeno tipo II, la glicoproteína 39 condrocítica humana, proteoglicanos, agregan, y también moléculas de expresión ubicua, como la proteína de unión al gen de la cadena pesada de inmunoglobulina (BiP), la glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI), proteínas de choque térmico y hnRNP-33 (RA33). Uno de los principales avances en el conocimiento de estos antígenos han sido los proporcionados por Union y colaboradores (Union y col., 2002) sobre anticuerpos dirigidos contra proteínas que contienen citrulina, que es derivada de una modificación post-traducciona l de la arginina por peptidilarginina deaminasa. Estos anticuerpos sí pueden ser más específicos de AR. Tanto la filagrina como algunas proteínas del choque térmico y otras dianas de los anticuerpos en la AR son moléculas ricas en argininas, susceptibles de cambiar una arginina por una citrulina, de manera que la respuesta se dirigiría a un péptido común o similar a otras proteínas antifilagrina, llamado péptido citrulinado. La presentación de estos péptidos por células presentadoras se asocia con elevada afinidad a moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, en particular a la secuencia de aminoácidos glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina localizados en la cadena de moléculas HLA-DR, en las posiciones 70-74, conocida como epítopo compartido (Gregersen y col., 1987). Esta

secuencia se encuentra en muchos genes DR asociados a la AR, como por ejemplo, DR4, DR14 y DR1. (Winchester, 1994; Zanelli y col., 2000; Feldmann, 2001; Silman and Pearson, 2002; Cope, 2003; Hill y col., 2003).

3.2.1.2 Infiltración celular en la AR

Además de los autoanticuerpos e inmunocomplejos, hay evidencias que sugieren que células T y células presentadoras de antígenos (APC) juegan un papel clave en las lesiones de las artritis reumatoide. En efecto, la mayor parte de células que se acumulan en los tejidos sinoviales reumatoides consisten en células T del tipo colaboradoras (T CD4⁺), células T citotóxicas, linfocitos B, macrófagos, células plasmáticas, monocitos y células dendríticas (Feldmann y col., 1996; Isomaki y col., 1999; Nakajima y col., 2001; Firestein, 2003). Las células B y las células dendríticas formarían estructuras semejantes a folículos linfoides con células T y macrófagos en aproximadamente el 20% de los pacientes. (Sweeney and Firestein, 2004a).

Varios modelos murinos de artritis comúnmente utilizados en el estudio de los mecanismos implicados en la sinovitis, como por ejemplo la artritis inducida mediante la administración de adyuvante o la artritis inducida mediante colágeno tipo II, son claramente dependientes de células T. La cepa de ratón MRL-lpr/lpr además de experimentar una proliferación excesiva de células T con aumento de la actividad colaboradora acompañada por el desarrollo de LES, desarrolla espontáneamente poliartritis.

3.2.1.3 Patrón de Citoquinas en la AR

Está demostrado tanto en modelos animales de artritis naturales, experimentales como en humanos, que las células T CD4⁺ responsables de la inducción de una respuesta patogénica en la AR presentan predominantemente un fenotipo Th1. Estas células contribuirían a la inflamación mediante la inducción de elevados niveles de citoquinas, como la IL-17 y el IFN- γ , con acciones pro-inflamatorias potentes que conducirían a la destrucción del cartílago y erosiones en el hueso.

Además, la producción de IL-1 y TNF- α por los macrófagos presentes en la sinovia puede estimular la proliferación de los fibroblastos e incrementar la producción de IL-6, GM-CSF, IL-8, y otras quimioquinas, así como también enzimas que contribuirían a la destrucción de la articulación. Estas citoquinas, a su vez, podrían activar los macrófagos próximos que continuarían produciendo citoquinas. Esto crearía un mecanismo de retroalimentación entre macrófagos y fibroblastos que perpetuaría la inflamación de la sinovia (Figura 1). Otros factores implicados recientemente en el desarrollo de la AR son, entre otros: la IL-18, un nuevo miembro de la familia IL-1, que es capaz de activar macrófagos, y que induciría la producción de IFN- γ , y la diferenciación local de células T hacia el fenotipo Th1 (Gracie y col., 1999); la IL-15, producida por macrófagos, podría inducir la producción de TNF- α a través de la activación de las células T sinoviales (Ziolkowska y col., 2000).

Las interacciones dependientes del contacto célula-célula entre los linfocitos T con otros tipos celulares en la AR también pueden

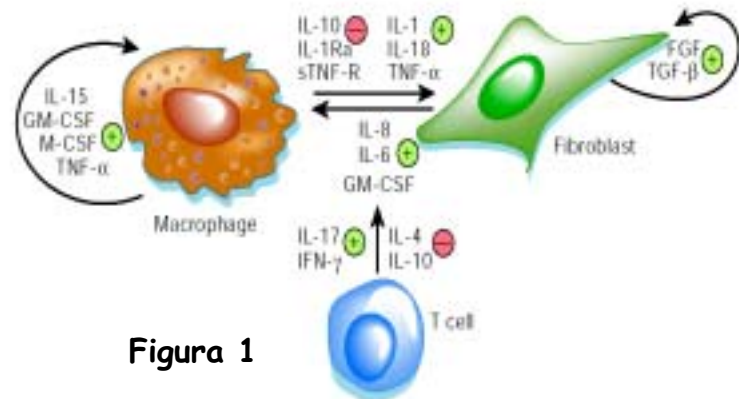


Figura 1

incrementar la producción de citoquinas y metaloproteinasas que incrementaría la destrucción de la articulación. Las interacciones sinérgicas entre varios tipos de citoquinas en la articulación inflamada también resulta en un aumento de metaloproteinasas y destrucción de la articulación. (Sweeney and Firestein, 2004a).

3.2.1.4 Activación de vías de transducción de señales y factores de transcripción en la AR

Las citoquinas inflamatorias activan vías de transducción de señales intracelulares y factores de transcripción en la sinovia (Firestein, 2003). Especialmente importantes en la regulación de la inflamación de la sinovia son el NF- κ B, mitogen-activated protein (MAP) quinasas, y el factor de transcripción "activador protein-1" (AP-1). NF- κ B y MAP están activados en la sinovia de pacientes con AR y regulan genes que contribuyen a la inflamación. Las vías de transducción de señales a través de estos dos factores se activan por un estímulo extracelular, ya sean citoquinas o mediadores inflamatorios. (Sweeney and Firestein, 2004b).

3.2.1.5 Terapia en la AR

Intervenciones terapéuticas recientes, basadas en la utilización de inhibidores de algunas de estas citoquinas, demuestran su importancia en la AR (Kim y col., 2000; Firestein, 2003). En particular, está demostrado que la aplicación de agentes anti-TNF- pueden disminuir o prevenir la progresión de lesiones en el hueso y cartílago en la AR y que su mecanismo de acción probablemente implica la supresión de otras citoquinas pro-inflamatorias, la disminución del infiltrado celular en la sinovia, la interferencia con la activación de osteoclastos y una disminución de la angiogénesis. La inhibición de IL-18 y IL-15 puede bloquear la diferenciación hacia el fenotipo Th1, y la producción de mediadores inflamatorios o la expresión de TNF- .

A parte del bloqueo directo de estas citoquinas pro-inflamatorias, la regulación puede llevarse a cabo también modulando niveles de citoquinas Th2 como la IL-4, IL-10 y la IL-13. En efecto, mientras las células Th1 se las describe como células pro-inflamatorias, las células T CD4+ con un fenotipo Th2 se las asocia con una respuesta más protectora (Scott y col., 1994; Miossec y col., 1996; Aarvak y col., 2000). Como ejemplo de ello, la IL-4 puede actuar inhibiendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1, el TNF- , la IL-6, la IL-8 y la IL-12 procedentes de macrófagos y monocitos. (Joosten y col., 1999; Adorini, 2003). No obstante, hay trabajos que demuestran que las células Th2 también pueden inducir efectos patogénicos (Khoruts y col., 1995; Lafaille y col., 1997). Estas observaciones indican que las células Th2 generadas en condiciones diferentes o a partir de animales con background genético diferente pueden también diferir en algunas de sus propiedades a pesar de la producción

común de citoquinas Th2. Además, en modelos de artritis, como la artritis inducida por colágeno (CIA), la adición de IL-4 al inicio de la enfermedad resulta en un marcado aumento de la inflamación e incremento de fibrosis tisular (van den Berg, 1998), sin embargo, disminuye la destrucción del cartílago. Esto indica que la IL-4 puede inducir ambos efectos inflamatorios y anti-inflamatorios en la articulación. Estos datos podrían explicar cómo una respuesta Th2 podría estar asociada con inflamación en la sinovia. En la sinovia de la AR, un dominio de la respuesta Th2 podría conducir a un incremento en la producción de autoanticuerpos como el factor reumatoide y así perpetuar la inflamación (Mageed y col., 1997).

Además de las citoquinas, otras moléculas se están considerando como posibles dianas terapéuticas, como por ejemplo las moléculas implicadas en las vías de transducción de señal de las MAP quinasas (MAPK) y NF- κ B. (Sweeney and Firestein, 2004a).

4. MODELOS DE AUTOINMUNIDAD

La mayor parte de nuestros conocimientos sobre las enfermedades autoinmunes se basa en el análisis de modelos espontáneos o experimentales en animales. Cada uno de estos modelos de enfermedades autoinmunes comparten características patológicas con la enfermedad humana que representan.

Se han descrito múltiples modelos espontáneos o experimentales de enfermedad autoinmune en diversas razas animales. Por ejemplo, cuadros semejantes a la esclerodermia en una cepa de pollos llamada UCD (Zhang

and Gilliam, 2002); lupus eritematoso sistémico (LES) en perros de la raza pastor alemán (Fournel y col., 1992); diabetes mellitus insulina-dependiente en pollos y en cepas de ratones NOD, aunque los modelos animales más empleados debido principalmente a su facilidad de manejo y crecimiento rápido han sido los modelos murinos, que proporcionan un sistema experimental muy valioso para analizar la patogénesis de estas enfermedades (Benavides and Guenet, 2001).

No obstante, hay que tener en cuenta: primero, la distancia genética entre estos modelos y el hombre, y segundo: la posibilidad de que el hombre probablemente use vías patogénicas que no existen en los animales de experimentación. (Jirholt y col., 2001).

4.1 MODELOS ANIMALES DE LES

Existen distintas cepas de ratones que desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune que recuerda al LES en el hombre:

La primera cepa descrita fue NZB (New Zealand Black) y (NZB X NZW)F1 (Akizuki y col., 1978). Las hembras desarrollan lesiones renales y anemia hemolítica produciendo espontáneamente anticuerpos anti-ADN de doble cadena.

Un segundo modelo es la cepa congénita MRL-lpr/lpr (MRL/lpr) que contiene el gen de linfoproliferación lpr. Estos animales desarrollan una linfadenopatía masiva debido a la acumulación espontánea de una subpoblación de células TCD4⁻CD8⁻ inmaduras anómalas (Takei, 1984). Además desarrollan un amplio espectro de autoanticuerpos (entre los que

destacan ANAs que incluyen anti-ADN y anti-Sm y FR), lesiones renales y artritis.

Una tercera cepa de ratones autoinmunes es la recombinante BXSB donde la susceptibilidad a la enfermedad está ligada al cromosoma Y y sólo los machos se ven afectados. Producen anticuerpos anti-ADN y desarrollan una nefritis severa y vasculitis.

Entre las anomalías histoinmunopatológicas, la característica dominante de todas estas cepas es el desarrollo de una enfermedad por inmunocomplejos que al depositarse en el glomérulo renal inducen la aparición de glomerulonefritis.

4.2 MODELOS ANIMALES DE AR

La cepa murina MRL-lpr/lpr, mencionada en el apartado anterior, constituye un modelo natural con elevada susceptibilidad a padecer también enfermedad autoinmune compatible con la artritis humana. (Andrews y col., 1978; Izui and Eisenberg, 1980).

El primer modelo animal experimental antígeno-específico relevante de AR establecido fue el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) tipo II, extraído del cartílago humano, pollo o rata, en ratas previamente irradiadas (Trentham y col., 1977). Estos animales desarrollaban poliartritis aguda acompañada de otros síntomas de enfermedad vascular del colágeno. La artritis inducida en este modelo fue sólo transitoria. Posteriormente, se han utilizado también como modelos de CIA tipo II ratones (Courtenay y

col., 1980; Burkhardt y col., 2002), monos (Yoo y col., 1988) y primates (Cathcart y col., 1986).

Desde entonces, se ha demostrado que otras proteínas tienen también la capacidad de inducir artritis (en ratas y ratón) como por ejemplo, el colágeno tipo XI (Cremer y col., 1994), proteoglicanos (Hollo y col., 2000) y la proteína de la matriz del cartílago oligomérico (Carlsen y col., 1998).

Además otros estudios demuestran que no es necesario en todos los sistemas la administración de un antígeno proteico para la inducción de la enfermedad, la administración de un adyuvante no-inmunogénico es suficiente para que el sistema inmune inicie un ataque inflamatorio a nivel de las articulaciones (Chang y col., 1998; Holmdahl y col., 1992; Vingsbo y col., 1996). Estos modelos han sido extensamente estudiados con el fin de identificar las causas genéticas, que nos permitan entender las vías patogénicas que conducen al desarrollo de la AR. (Jirholt y col., 2001).

En el 1985 Gleichmann y colaboradores describieron el desarrollo de poliartritis progresiva crónica, similar en varios rasgos a la AR humana, en ambas manifestaciones articulares y extraarticulares, junto con otros síntomas característicos de las enfermedades del tejido conectivo, en la cepa híbrida de ratones [BALB/c X A]F1 previamente inyectada con células linfoides de la cepa parental BALB/c. (Pals y col., 1985). En 1990 nuestro grupo describió la presencia de FR en este modelo animal (Gelpi y col., 1990).

5. ENFERMEDAD DEL INJERTO CONTRA EL HUÉSPED (EICH) COMO MODELO DE AUTOINMUNIDAD

Mediante la inducción de la EICH en ratones, es posible inducir experimentalmente distintas enfermedades autoinmunes no-órgano específicas que presentan un cuadro clínico similar a los observados en las distintas enfermedades autoinmunes del tejido conectivo en el hombre (Pals y col., 1985; Gelpi y col., 1990). El estudio de esta enfermedad permite, no sólo profundizar en el estudio de los posibles mecanismos etiopatogénicos de dichas enfermedades autoinmunes, sino también, estudiar los mecanismos implicados en el reconocimiento y tolerización de los antígenos propios.

Clásicamente se ha definido la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) como la expresión clínica que se produce en un individuo transplantado, con linfocitos inmunocompetentes de un donante portador de antígenos de histocompatibilidad distintos, y a los que el receptor no es capaz de responder. Actualmente se sabe que esta enfermedad es el resultado de una serie de acontecimientos inmunológicos que se inician con el reconocimiento de antígenos de histocompatibilidad del huésped, por parte de linfocitos T del donante.

Básicamente se habla de tres tipos de trasplantes: 1) trasplante singénico, es el que se da entre dos individuos genéticamente idénticos; 2) trasplante semialogénico, el que se da entre dos individuos que comparten la mitad de la dotación genética; 3) trasplante alogénico, el que se da entre dos individuos que no comparten ningún haplotipo.

Existen diversas maneras de inducir la EICH en ratones que a menudo limitan la extrapolación de los resultados de un modelo a otro. Básicamente los modelos de EICH difieren entre sí en relación a tres características claves: 1) la extensión y el tipo de tratamiento acondicionador y citorreductor del receptor utilizando la irradiación total del individuo o quimioterapia; 2) la disparidad genética existente entre donante y receptor; y 3) la pureza, tipo y número de células donantes transferidas. Estas tres variables influyen de manera considerable sobre el tipo de EICH resultante. (Murphy, 2000).

Uno de los modelos de EICH que se ha utilizado para la inducción de modelos murinos de autoinmunidad, y que nosotros hemos empleado para la realización de este proyecto, implica la transferencia de linfocitos parentales a ratones híbridos F1 no irradiados ni inmunodeprimidos (P F1). (Rolink y col., 1982). Los animales huéspedes o receptores F1 son genéticamente tolerantes a las células donantes de origen parental, pero los linfocitos injertados reaccionan contra los antígenos de histocompatibilidad alogénicos presentes en las células del huésped (Shearer and Polisson, 1980; van Rappard, 1982).

La EICH que se desarrolla en el hombre post-transplante de médula ósea se rige por mecanismos etiopatogénicos distintos a los que operan en el modelo murino P F1. En este último como mencionamos en líneas anteriores las cepas huéspedes presentan un sistema inmune intacto a diferencia de los receptores de un transplante de médula ósea en el hombre, los cuales o bien son inmunodeficientes o deben ser previamente inmunodeprimidos.

5.1 TIPOS DE EICH

La EICH puede manifestarse básicamente de dos formas distintas:

1.- EICH inmunosupresora o aguda: Clínicamente se caracteriza por una hipoplasia severa del sistema linfohematopoyético que conduce a una anemia aplásica y a una hipogammaglobulinemia, debido a la activación de ambos tipos de células $CD4^+$ y $CD8^+$ donantes en respuesta a aloantígenos del receptor. La EICH aguda está asociada a cambios en la arquitectura tímica y a una reducción en la celularidad debida principalmente a una disminución en la población de timocitos doble positiva, $CD4^+CD8^+$ (Krenger y col., 2000). Los animales con EICH aguda mueren entre la primera y segunda semana de la administración del inóculo. (Rolink y col., 1982; Rozendaal y col., 1989; Kataoka y col., 2001).

2.- EICH immunoestimuladora o crónica: Clínicamente se caracteriza por una hiperplasia linfoide persistente, de principalmente células B, que conduce a una hipergammaglobulinemia y a la formación de autoanticuerpos frente a diferentes antígenos nucleares (ADNdc, histonas), eritrocitos y timocitos, debido a la activación selectiva de células T $CD4^+$ donantes que actuarían como células colaboradoras de las células B del huésped. Este fenómeno autoinmune se acompaña de glomerulonefritis por inmunocomplejos y frecuentemente depósitos de inmunoglobulinas en la membrana basal de la piel. Sus síntomas recuerdan a la enfermedad del lupus eritematoso sistémico (Gleichmann y col., 1982, van Rappard-van der Veen y col., 1982, Moser y col., 1987; Gelpi y col., 1990; Gelpi y col., 1988; Gelpi y col., 1994; Kataoka y col., 2001).

Según las combinaciones de cepas murinas utilizadas en el modelo semialogénico de EICH (P F1), pueden inducirse una u otra forma de enfermedad (EICH) o variantes de la misma. La forma crónica de EICH se describió por primera vez en cepas murinas con diferencias en antígenos MHC de clase II entre donante y huésped. La enfermedad de tipo agudo se describió cuando las diferencias donante-huésped se encontraban tanto en antígenos de clase I como de clase II. Sin embargo, en ciertas cepas de ratones, el reconocimiento de diferencias en antígenos de clase I y II en el huésped F1 por linfocitos parentales proporciona un modelo crónico o estimulador de EICH (Gleichmann y col., 1982; Gelpi y col., 1990; Tschetter y col., 2000; Sakurai y col., 2000).

5.2 EJEMPLOS DE MODELOS MURINOS DE EICH

La cepa híbrida murina (C57BL/6 X DBA/2)F1 (BDF1) desarrolla diferentes formas de la EICH según reciba células linfoides de una u otra cepa parental, C57BL/6 o DBA/2. (Via y col., 1987; Hakim y col., 1991; Tschetter y col., 2000). Cuando linfocitos provenientes de la cepa C57BL/6 son transferidos a ratones híbridos BDF1, estos desarrollan una forma de EICH inmunosupresiva aguda, con hiperplasia linfoide temprana y actividad de células NK aumentada seguido de la generación de actividad CTL anti-huésped, depresión de la función de otras células T, pérdida de peso, y, finalmente, la muerte del animal.

Cuando se transfieren linfocitos provenientes de la otra cepa parental, DBA/2, a los ratones receptores BDF1, estos desarrollan una forma de EICH inmunoestimuladora crónica asociada a una hiperplasia de células B, producción de autoanticuerpos y glomerulonefritis mediada por

inmunocomplejos, que se asemeja en varios aspectos a la enfermedad del LES humana, aunque las diferencias en antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad entre ambas cepas murinas se encuentran a nivel de Ag de clase I y II (Tschetter y col., 2000). Se ha demostrado que la EICH crónica desarrollada en esta cepa murina se debe a la activación de células B del huésped por células Th CD4⁺ alorreactivas del donante. (Rus y col., 1995; Williamson y col., 1996; Murphy, 2000).

En los años 90, otros estudios (Umland y col., 1992; Via and Finkelman, 1993; De Wit y col., 1993; Via y col., 1994; Williamson y col., 1996; Okubo y col., 1999) realizados con estas mismas cepas murinas, analizaron las interleuquinas que intervenían en el desarrollo de cada uno de los tipos de EICH agudo y crónico. Los resultados sugirieron que el desarrollo de la forma aguda de la EICH estaba asociada con la producción de IL-2 e IFN- γ y podía inhibirse completamente con la administración de anti-IL-12 y parcialmente con la administración de IFN- γ (Via and Finkelman, 1993), mientras que la forma crónica de la enfermedad se caracterizaba por la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 y podía prevenirse mediante la neutralización in vivo de la IL-4 así como también mediante la administración de rmIL-12 (De Wit y col., 1993; Okubo y col., 1999). El desarrollo de las distintas formas de EICH en huéspedes murinos BDF1 es un reflejo de la producción diferencial de citoquinas por distintas subpoblaciones de Th CD4⁺.

En un estudio más reciente, Yasuro Kataoka y colaboradores (2001) analizaron mecanismos inmunopatogénicos responsables de la lesión celular y tisular que caracterizaba a cada una de las formas de EICH inducida en la cepa BDF1. Concretamente, examinaron el efecto de las células T donantes

sobre las poblaciones linfocitarias del huésped, la expresión de citoquinas y de Fas ligando en los órganos diana de las formas aguda y crónica de la EICH desarrollada en estos ratones. En ambas formas de la EICH, observaron la patología que caracteriza la enfermedad, y observaron quimerismo de células T donantes, en el bazo y el hígado. Sin embargo, diferencialmente los animales con EICH aguda presentaron un aumento de citoquinas Th1 en estos órganos y depleción de linfocitos del huésped mediada principalmente por interacciones Fas-FasL, mientras que los animales con EICH crónica presentaron un aumento de citoquinas Th2 en estos órganos y expansión de esplenocitos B y células T NK1.1⁺ hepáticas, del huésped. Todo ello sugiere que las respuestas inmunes mediadas por células T donantes en órganos diana son importantes para ambas formas aguda y crónica de EICH. (Kataoka y col., 2001).

Datos previamente publicados por nuestro laboratorio demostraron el desarrollo de dos modelos diferentes de la forma crónica de EICH en la cepa híbrida murina (BALB/c X A/J)F1 según recibiese linfocitos de una u otra cepa parental, BALB/c o A/J (Gelpi y col., 1988; Gelpi y col., 1990; Gelpi y col., 1994). Cuando los linfocitos donantes eran de origen BALB/c, los receptores F1 desarrollaban vasculitis localizadas preferentemente en las orejas, alopecia y, con menor frecuencia, afectación renal, así como también, inflamación de las articulaciones de las patas delanteras similar a la artritis reumatoide (AR) en el 25% de los animales, después de 10 meses de haber inducido la EICH, con la presencia de factor reumatoide y autoanticuerpos anti-ADNdc y anti-Histonas, principalmente. Signos histoquímicos distintivos de sinovitis, se detectaron antes de los 3 meses de evolución de la enfermedad. Cuando los linfocitos donantes eran de origen A/J, los receptores F1 desarrollaban de manera predominante afectación

renal y, con menor frecuencia, inflamación de partes blandas de las extremidades superiores, ocasionalmente con la pérdida de las uñas. En suero se detectaron autoanticuerpos anti-U1 y anti-U3RNP. Ambos anticuerpos son frecuentes en la esclerodermia. (Gelpi y col., 1988; Gelpi y col., 1990). En ambos modelos se apreció quimerismo de células donantes principalmente en el bazo de los animales huésped. Este quimerismo, por lo menos en el modelo CAF1+BALB/c, es dependiente de la presencia de células T CD8⁺ del donante. Cuando el inóculo se deplecionaba de células T CD8⁺ (Vidal y col., 1996) disminuía la respuesta inmune inflamatoria y el tipo de enfermedad que se producía era compatible con LES, con aumento y aparición temprana de autoanticuerpos, cambio en el repertorio de los mismos (anti- U1snRNP) y ausencia de quimerismo. Aunque ambas cepas murinas, CAF1 y BALB/c, difieren en antígenos H-2 de clase I y II, no se detectó ningún signo de EICH aguda.

Además, datos previos publicados también por nuestro laboratorio demostraron una asociación entre la producción de un patrón de citoquinas preferentemente de tipo Th2 y el desarrollo de la forma crónica de la EICH inducida en huéspedes (BALB/c X A/J)F1 (Vidal y col., 1996).

Finalmente, Morai y colaboradores (1996) demostraron que todos los ratones con un background genético BALB/c, desarrollaban espontáneamente poliartropatías inflamatorias crónicas semejantes a la artritis reumatoide en el hombre. Un desbalance Th1 podría por consiguiente incidir en una respuesta de enfermedad inflamatoria articular en el modelo estudiado anteriormente (A/J X BALB/c)F1 +BALB/c.

6. INTERLEUQUINA-12

6.1 ESTRUCTURA DE IL-12 Y SU RECEPTOR

Es una molécula compuesta por dos cadenas polipeptídicas N-glicosiladas de 35 KDa y 40 KDa, respectivamente, codificadas por genes distintos, localizados en diferentes cromosomas (cromosoma 3 y 5, en humanos y cromosomas 6 y 11, en ratones, respectivamente), y que unidas covalentemente por un puente disulfuro forman el heterodímero biológicamente activo p70. La IL-12p40 puede producirse como monómeros libres u homodímeros (p40₂) en cantidades que exceden las del heterodímero IL-12p70. A diferencia de p40, p35 no se secreta en forma monomérica. (Wolf y col., 1991; Merberg y col., 1992; Gately and Brunda, 1995; Trinchieri, 1995; Gately and Mulqueen, 1996; Gately y col., 1998; Caspi, 1998; Gadina y col., 2003; Adorini, 2003).

El receptor de IL-12 (IL-12R) es un complejo glicoprotéico formado por al menos dos subunidades, α 1 y β 2, relacionadas estructuralmente con la superfamilia de receptores de citoquinas tipo I. Los genes para la α 1 y β 2 residen en los cromosomas 19p13.1 y 1p31.2, respectivamente. La afinidad de IL-12 por cada una de ambas subunidades por separado es baja, se requiere la co-expresión de las dos subunidades para que la citoquina se una al receptor con elevada afinidad. La cadena p40 interacciona con la subunidad α 1 y la cadena p35 es la responsable de inducir la señal biológica al interaccionar predominantemente con la subunidad β 2. La expresión de la subunidad responsable de transmitir la señal, IL-12R- β 2, es inducida tras activación antigénica vía TCR, se mantiene en presencia de INF- γ y

desaparece rápidamente en presencia de IL-4. (Szabo y col., 1997; Caspi, 1998).

Al igual que muchos receptores de citoquinas, el IL-12R carece de actividad enzimática intrínseca, de manera que transduce la señal a través de la acción de la quinasa janus (JAKs) (O'Shea y col., 2002). En mamíferos hay 4 JAKs, tirosín quinasa 2 (TYK2), JAK1, JAK2 y JAK3. La TYK2 y JAK2 están implicadas en la señalización de la

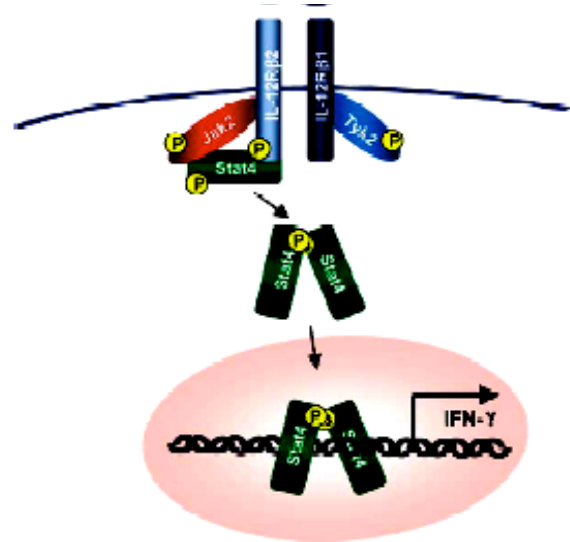


Figura 2

IL-12; TYK2 se asocia con la subunidad 1, y JAK2 con la subunidad 2 (Zou y col., 1997). Tras la unión del ligando al receptor, las JAKs asociadas al receptor se activan mediante transfosforilación. Las JAKs activadas, a su vez, fosforilan las tirosinas localizadas en el dominio intracelular del IL-12R, y estas fosfotirosinas forman un sitio de unión para los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs). Los STATs unidos a las cadenas del receptor fosforilado son también a su vez fosforilados por las JAKs. Entonces, los STATs fosforilados dimerizan formando homo- o heterodímeros, translocan al núcleo, se unen a secuencias específicas del ADN, y modulan la expresión de genes (Figura 2). (Watford y col., 2003).

Aunque se ha demostrado que tanto STAT1 como STAT3 y STAT4 se activan vía IL-12, parece ser que STAT4 es la proteína más específica en la vía de señalización de IL-12. (Jacobson y col., 1995). En ratones knockout de STAT4 están afectadas la producción de IFN- γ y la polarización hacia

Th1 (Kaplan y col., 1996). Se ha demostrado que los interferones de tipo I al igual que la IL-12 activan STAT4 no sólo en humanos sino también en ratones (Nguyen y col., 2002).

6.2 FUENTE CELULAR Y DIANAS DE IL-12

Es una citoquina pleiotrópica producida principalmente por células fagocíticas y APCs (monocitos-macrófagos, DCs) y, en menor extensión, leucocitos polimorfonucleares, mastocitos, células representativas del tejido conectivo, células de Langerhans, queratinocitos, neutrófilos y células del estroma tímico (Ma y col., 1995; Cassatella y col., 1995; Kang y col., 1996; Caspi, 1998; Adorini, 2003). (Figura 3).

Hay dos vías de producción de IL-12: 1) Independiente de células T, provocada por potentes inductores como LPS, bacterias Gram (+), bacterias Gram (-) y parásitos intracelulares, que activarían directamente a células del sistema inmune innato a producir IL-12 (Takenaka y col., 1997; Caspi, 1998); 2) Dependiente de células T, potenciada por la interacción entre células productoras de IL-12 y células T activadas a través de moléculas coestimuladoras como por ejemplo, CD40/CD40L, CD58/CD2 y B7/CD28. (Kennedy y col., 1996; Takenaka y col., 1997; Caspi, 1998).

Sus principales dianas son células T y células NKs, aunque también puede actuar directamente sobre células B y APCs. (Gately y col., 1992; Gately y col., 1998; Caspi, 1998) (Figura 3).

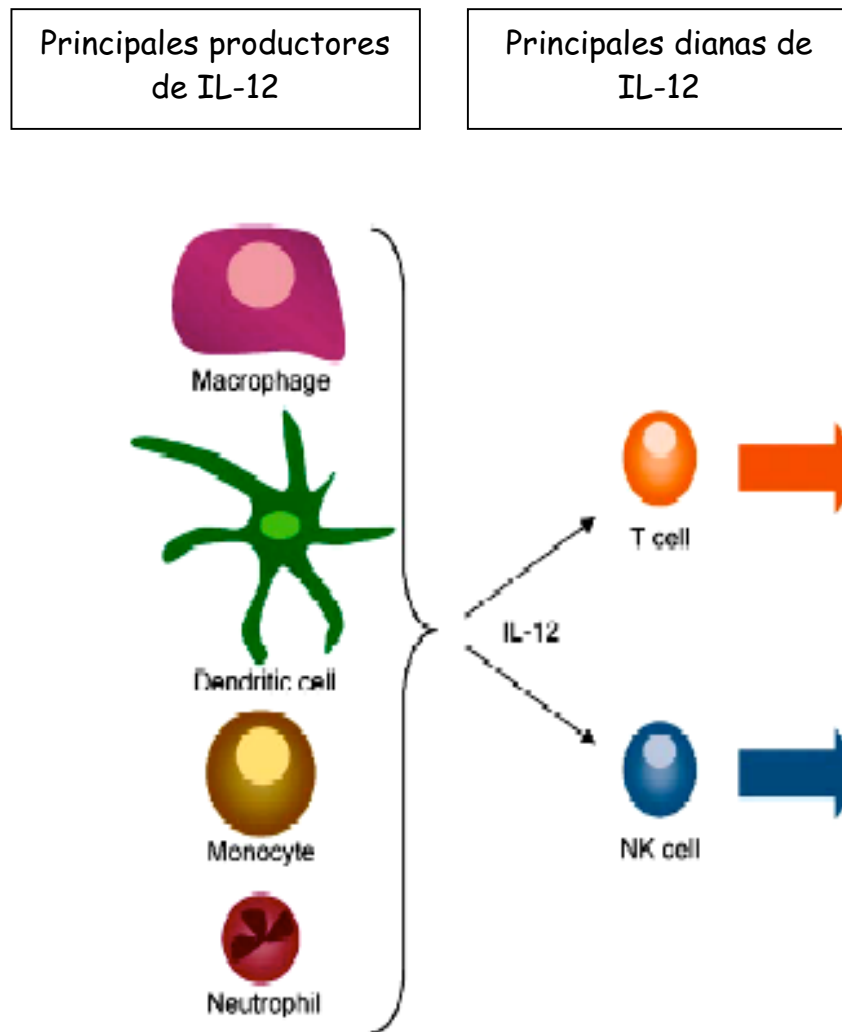


Figura 3

6.3 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA IL-12

6.3.1 Regulación de las respuestas Th1/Th2 mediante IL-12

Una de las actividades más importante que ejerce la IL-12, es su capacidad de regular el balance entre células Th1 y Th2. Las células Th1 secretan IL-2 y INF- γ , promoviendo así la inmunidad mediada por células; mientras que las Th2 producen IL-4, -5, -6, -10 y -13 (esta última, como ya comentamos anteriormente, también producida por células Th1 en determinadas circunstancias), facilitando la inmunidad humoral (Paul and Seder, 1994). Estudios *in vitro* realizados con células de origen humano (Marshall y col., 1995) y murino (Schmitt y col., 1994) y estudios *in vivo* llevados a cabo en modelos murinos han demostrado que la IL-12 promueve respuestas Th1, a través de tres vías: (1) promueve la diferenciación de células T nativas, durante el primer encuentro con el antígeno, hacia una población de células Th1 capaces de producir grandes cantidades de INF- γ tras su activación, (2) sirve de coestímulo necesario para una máxima secreción de INF- γ por células Th1 diferenciadas que responden a un antígeno específico, y (3) estimula el desarrollo de células Th1 productoras de INF- γ a partir de una población de células T de memoria que interaccionan con un antígeno con el que han sido previamente expuestas.

No obstante, a pesar del papel importante que juega el INF- γ en la inducción del desarrollo de células Th1 mediante IL-12, datos bibliográficos que demuestran que la IL-12 es también capaz de inducir el desarrollo de células Th1 y suprimir el desarrollo de células Th2 independientemente de INF- γ (Wang y col., 1994; Swihart y col., 1995; Wenner y col., 1996; Bradley y col., 1996).

Aunque más comúnmente se ha encontrado que la IL-12 promueve respuestas Th1 mientras inhibe la producción de citoquinas Th2 como IL-4 o TGF- β , bajo ciertas condiciones experimentales se ha observado que también puede aumentar respuestas Th2 (Schmitt y col., 1994; Wynn y col., 1995). El que la IL-12 inhiba o aumente respuestas Th2 parece ser dependiente de la presencia en el medio de otras citoquinas y del estado de maduración de las células T. (Gately y col., 1998).

6.3.2 Inducción de la secreción de citoquinas mediada por IL-12

Otra de las propiedades de la IL-12 es su habilidad de inducir la producción de otras citoquinas, particularmente, grandes cantidades de IFN- γ a partir de células T nativas y de memoria, células NK y linfocitos B. La producción de IFN- γ inducida por IL-12 está sinérgicamente aumentada por una variedad de citoquinas que incluyen TNF- α , IL-1, IL-2 y IL-18 por otro lado, la producción de IFN- γ inducida por IL-12 disminuye por la acción de la IL-4, IL-10 y TGF- β . (Tripp y col., 1993).

La IL-12 también induce, en pequeñas cantidades, la producción de otras citoquinas como el TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-8.

6.3.3 Efectos de la IL-12 sobre respuestas mediadas por anticuerpos

La IL-12 puede aumentar o inhibir la inmunidad humoral, dependiendo del isotipo de inmunoglobulina y del estímulo para la formación del anticuerpo. La administración de IL-12 a ratones puede aumentar las respuestas de anticuerpos IgG2a, IgG2b y IgG3 a antígenos proteicos (Germann and Rude, 1995). Estos isotipos están asociados a respuestas Th1. Contrariamente, la IL-12 suprime las respuestas de anticuerpos IgG1 y IgE, Th2-dependientes, en una variedad de modelos experimentales (McKnight y col., 1994). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias en que es capaz de aumentar la producción de IL-4, la IL-12, puede aumentar la producción de IgE. (Wynn y col., 1995; Germann and Rude, 1995). En la mayoría de modelos, el efecto de la IL-12 sobre la respuesta humoral son al menos parcialmente mediados por IFN- γ , aunque la IL-12 ejerce también un efecto directo sobre células B. (Gately y col., 1998).

6.3.4 Otras actividades de la IL-12

La IL-12 tiene, además, la capacidad de incrementar la actividad citotóxica de TCD8⁺ y NKs y la de aumentar la expresión de proteínas asociadas a la citotoxicidad como granzyme A, granzyme B y perforinas. (Gately y col., 1998).

Ejerce un efecto sinérgico con activadores de proliferación linfocitaria (células alogénicas, CD3, lectinas, phorbol diester, IL-2), aumentando la proliferación de células T y NKs. Sin embargo, suprime la

proliferación de células T / y NKs inducida con elevadas dosis de IL-2. (Perussia y col., 1992; Trinchieri and Scott, 1995).

Además, en combinación con otros factores de crecimiento hematopoyéticos, promueve el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas *in vitro*, e induce focos hematopoyéticos extramedulares en el bazo e hígado de ratones tratados con IL-12. No obstante, un prolongado tratamiento con elevadas dosis de IL-12 *in vivo* provoca anemia severa y neutropenia. (Hirayama y col., 1994; Gately y col., 1998).

6.4 EFECTO DE LA IL-12 SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La IL-12 está implicada en la respuesta inmune mediada por células que se desarrolla en enfermedades infecciosas contra varios patógenos intracelulares confiriendo protección. Está demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti-IL-12 inhibe la respuesta inmune protectora contra *L. major*, *Listeria m.*, *T. Gondii*, *Yersinia enterocolitica* y *Candida albicans*, en los distintos modelos murinos que resultan de la infección con cada uno de estos patógenos. Además la administración de IL-12 a cepas de ratón susceptibles a infecciones induce protección inmunológica. Este efecto protector de la IL-12 es crucial en infecciones primarias, una vez establecida la respuesta Th1 protectora esta puede mantenerse de manera independiente de IL-12. (Seder y col., 1996).

6.5 EFECTO DE IL-12 SOBRE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

6.5.1 Efecto de la IL-12 sobre enfermedades autoinmunes Órgano-Específicas

A diferencia de lo que ocurre en las enfermedades infecciosas, las enfermedades autoinmunes órgano-específicas, que incluyen la encefalitis autoinmune experimental (EAE), la colitis inducida por 2,4,6-ácido sulfúrico trinitrobenzeno, la diabetes en ratones NOD, la enfermedad intestinal inflamatoria, la uveitis autoinmune experimental (EAU), están mediadas por una respuesta Th1 patogénica dependiente de IL-12 y que además es crucial para el mantenimiento de la misma. El tratamiento con anti-IL-12 retrasa el inicio, reduce la severidad y previene la progresión de este tipo de enfermedades.

Sin embargo, aunque está claramente documentada la necesidad de IL-12 para generar células efectoras Th1 autopatogénicas en la autoinmunidad mediada por células en estos tipos de enfermedades, bajo ciertas circunstancias puede también inhibir la patogénesis de la enfermedad. Este efecto paradójico de la IL-12 ha sido demostrado en numerosos modelos experimentales de enfermedad autoinmune órgano-específicas tras la administración de IL-12 exógena. Un ejemplo lo constituye la diabetes inducida en ratones NOD: la administración exógena diaria de IL-12 acelera la enfermedad obteniéndose el efecto contrario si se la administra de manera intermitente (O'Hara y col., 1996; Caspi, 1998). En el modelo de EAU, la IL-12 promueve la enfermedad cuando se añade a cultivos de linfocitos de donantes inmunizados con la proteína de la retina IRBP que son subsiguientemente transferidos a receptores no tratados, y sin embargo

ejerce un efecto protector con la administración de la citoquina exógena a ratones inmunizados activamente con IRBP en adyuvante de Freund y toxina de *Bordetella pertussis*.

Se han observado también efectos paradójicos de otras citoquinas asociadas con la patogénesis de la enfermedad en varios de estos modelos. Por ejemplo, la administración de anticuerpos anti-IFN- γ agrava la enfermedad en el modelo murino de EAE mientras que la administración de rIFN- γ ejerce un efecto protector. (Burastero y col., 1998).

6.5.2 Efecto de IL-12 sobre enfermedades autoinmunes Sistémicas

El papel que juega la IL-12 en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes sistémicas permanece todavía por esclarecer. Se han descrito resultados controvertidos dependientes de las dosis, el momento y la manera en que es administrada esta citoquina en este tipo de enfermedades.

Hay varios estudios que demuestran que la IL-12 está implicada en la patogénesis de la nefritis lúpica desarrollada en las cepas de ratones MRL-lpr/lpr y NZB. En particular, la inyección de IL-12 en el riñón de ratones MRL-Fas^{lpr}, mediante un sistema de transferencia génica que de manera persistente libera la citoquina de forma local y sistémica, provoca la enfermedad renal autoinmune favoreciendo la acumulación intrarenal de células T CD4⁺, CD8⁺ y doble negativas secretoras de INF- γ . (Schwartzing y col., 1999).

Existen también numerosos artículos que estudian el papel que la IL-12 puede tener en el desarrollo de la artritis en modelos experimentales. En el modelo murino de artritis inducida mediante colágeno tipo II (CIA), Germann y colaboradores, demostraron que la administración de IL-12 inducía artritis severa en ratones DBA/1 previamente inmunizados con colágeno tipo II en adyuvante incompleto de Freund, a la vez que incrementaba la incidencia del modelo de la enfermedad. En un estudio posterior, Joosten y colaboradores (Joosten y col., 1999), demostraron que la IL-12 regulaba diferencialmente el desarrollo de la artritis en fases iniciales y tardías de la CIA y que esta regulación diferencial dependía de la inducción, mediada por la IL-12, de citoquinas endógenas como la IL-1 , TNF- , IFN- y IL-10. Kasama utilizando el mismo modelo de artritis demostró un efecto regulador bifásico dosis-específico de la IL-12 en el desarrollo de esta enfermedad inducida en la cepa de ratones DBA/1J: la administración de dosis bajas de rmIL-12 (5 ng/día) aceleraba el inicio e incrementaba la severidad de la enfermedad, mientras que la administración de dosis elevadas (500 ng/día) atenuaba la inflamación artrítica. Las dosis bajas de IL-12 inducían la producción de TNF- y las dosis elevadas inducían la producción de IL-10 y corticosterona y la supresión de los niveles de anticuerpos anticolágenos. (Kasama y col., 1999).

Parks y colaboradores demostraron que la administración i.p de un vector adenoviral capaz de sobreexpresar de manera transitoria y sistémica IL-12 en este mismo modelo murino de artritis inducida por colágeno aceleraba la progresión e incrementaba la severidad de la enfermedad.(Parks y col., 1998).

Rempel y colaboradores demostraron que la administración i.p de rIL-12 en el modelo murino OVA C57BL/6, Th2-dependiente, polarizaba la respuesta Th2 hacia respuestas efectoras Th1. Concretamente, incrementaban los niveles en suero de INF- y disminuían los de IL-4 e IL-10; inhibía la producción de IgE e IgG1 y estimulaba la de IgG2a. (Rempel y col., 1997).

También se ha demostrado el papel de la IL-12 como adyuvante en la respuesta humoral, incrementando la producción de IgG2a e IgG2b a través de la acción directa sobre células B (Schmitt y col., 1997; Metzger y col., 1997). Contrario a esto están los estudios basados en cultivos de linfocitos procedentes de pacientes con LES que demostraron una disminución de Igs y Acs anti-ADNdc en presencia de IL-12. (Houssiau y col., 1997; Caspi, 1998).

6.6 EFECTO DE IL-12 SOBRE LA EICH

Los estudios *in vivo* del papel que juega la IL-12 en la inducción de la EICH en el modelo murino [C57BL/6 X DBA/2]F1 no irradiado inyectado con linfocitos de una u otra cepa parental, mediante la aplicación de diferentes protocolos de administración de IL-12 exógena, o mediante la neutralización de la citoquina con anticuerpos anti-IL-12 mostraron que la IL-12 podía estimular el desarrollo de la forma aguda de EICH en ratones que normalmente deberían desarrollar la forma crónica de la enfermedad.

Concretamente, Charles S. Via y colaboradores, 1994, demostraron que la administración i.p. de 100 ng/día de IL-12 durante los primeros 5 días después de la transferencia de células de la cepa parental DBA/2 en el

híbrido BDF1 (modelo de EICH crónica): 1) disminuía la producción de autoanticuerpos, específicamente, reducía de manera significativa el incremento en suero de los niveles de IgG anti-ADN, que caracteriza el modelo DBA/2 BDF1; 2) reducía el incremento en los niveles en suero de IgG1, IgG2a, IgG3 y IgE, que tienen lugar típicamente en el modelo DBA/2 BDF1; 3) inducía actividad CTL contra el huésped; y 4) conducía a la eliminación de la mayoría de linfocitos T y B del huésped dos semanas después de la transferencia de células parentales.

Eilidh Williamson y colaboradores, demostraron que la administración de 100 ng/día de rmIL12 a partir del día -1 hasta el día 4 y luego desde el día 7 hasta el día 11 post-inducción de la EICH, no sólo, convertía la forma crónica de la enfermedad que se desarrollaba después de la transferencia de células parentales DBA/2 en el híbrido BDF1, en un síndrome que recuerda la forma aguda de la EICH, sino que, agravaba las consecuencias sistémicas de esta variante de la enfermedad, con pérdida de peso, la producción de IFN- γ , la disminución de IL-10 e, induciendo el 100% de mortalidad alrededor del día 15 post-EICH.

Este mismo autor y colaboradores también demostraron que la neutralización de IL-12 endógena, mediante la administración *in vivo* con anticuerpo policlonal anti-IL-12 durante la fase aferente de la forma aguda de la EICH que se desarrolla en el modelo C57BL/6 BDF1, reducía considerablemente las consecuencias patológicas e inmunopatológicas de esta variante de EICH, de manera que no había una pérdida de peso significativa. También producía disminución del porcentaje de mortalidad, del grado de esplenomegalia y disminuía significativamente la producción de IFN- γ a la vez que incrementaba de manera significativa la producción de IL-10 y disminuía la actividad de células NK. Sin embargo, el tratamiento

con anti-IL-12 no prevenía la generación de actividad CTL anti-huésped que acompañaba los rasgos patológicos de la forma aguda de la EICH.

Paradójicamente, Sykes, M., 1995 y Yang, Y.-G., 1997 demostraron que la administración exógena de IL-12 podía ejercer un efecto protector contra la forma aguda de la EICH al ser inducida en el modelo p F1 irradiado letalmente. Este efecto inhibitorio que ejerce la IL-12 sobre la EICH aguda se observó por primera vez en el modelo murino, A/J B10 (Sykes y col., 1995), y, más tarde fue confirmado en otras combinaciones de cepas murinas, incluyendo, B10.A B6, C3H B6 y BALB/c B6. (Dey y col., 1998). En todos estos modelos existen diferencias en todo el MHC además de en múltiples antígenos menores de histocompatibilidad entre donante y receptor. Sin embargo, en todos estos modelos la IL-12 ejerce un efecto protector relativamente pobre contra la forma crónica de la EICH.

Con la inyección i.p. de una simple dosis de 4900U/animal de IL-12 el mismo día de la inducción de la EICH en el modelo murino A/J B10 se observó: 1) retraso en el comienzo de mortalidad y reducción en el grado de pérdida temprana del peso y otras manifestaciones clínicas debidas a la forma aguda de la EICH; 2) efecto bifásico sobre los niveles en suero de IFN- γ , aumentando los días 2 y 3 y disminuyendo el día 4 post-inducción de la enfermedad; 3) alteraciones en la cinética de expansión de células T donantes, obteniéndose una reducción en los porcentajes de esplenocitos CD4⁺ y CD8⁺ de origen donante el día 4 post-inducción de la enfermedad y un incremento en el porcentaje de esplenocitos CD8⁺ donantes el día 7; 4) efecto protector aditivo con la administración, además, de células de médula ósea de origen del receptor deplecionadas de células T, y, 5) una completa reconstitución linfohematopoyética con células donantes en la mayoría de los animales inducidos. De hecho, con una única inyección de IL-12 a dosis tan bajas como 625 U/animal el mismo día de la inducción de la

enfermedad se conseguía una inhibición significativa de la EICH. El análisis llevado a cabo en este mismo modelo después de la administración de repetidas dosis de IL-12 demostró aumento de mortalidad causada por la toxicidad debida al exceso de citoquina. (Yang and Sykes, 1999).

También se ha observado que el tratamiento con una simple dosis de IL-12 ejerce un efecto protector contra la EICH inducida en la combinación de cepas CBD2F1 (H-2kXd) B6D2F1 (H-2bxd) haploidénticas, aunque con un grado de protección diferente al que proporciona la IL-12 en los modelos murinos con diferencias en la totalidad del MHC más en múltiples antígenos menores de histocompatibilidad. Una razón a este hecho podría ser el que se consiguiera una mejora en la función inmune cuando donante y receptor compartieran un haplotipo de MHC, confiriendo una mejor protección contra infecciones que pudiesen iniciar la EICH. (Yang and Sykes, 1999).

Los resultados del estudio publicado por Okubo et al., 1999, demuestran por primera vez un papel preventivo de la IL-12 en el desarrollo de cEICH inducido en el modelo murino [DBA/2 (C57BL/10 X DBA/2)F1]. Básicamente, mediante la administración i.m del plásmido de ADN, pCAGGSIL-12, que codifica para la IL-12, se altera la relación IL-4/INF- en suero, disminuyendo los niveles de IL-4, se suprime la hipergamaglobulinemia, disminuyendo los niveles de IgG e IgG1 y aumentando los de IgG2a, baja la producción de Acs anti-ADN y previene la proteinuria y la glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos, disminuyendo los depósitos de Igs, sobretodo del subtipo IgG1.

6.7 EFECTO DE IL-12 SOBRE EL SHOCK SÉPTICO

A pesar de que TNF- α e IL-12 juegan un papel importante en la defensa contra microorganismos, una sobreproducción de ambas citoquinas juega un papel central en la patogénesis del shock séptico.

La letalidad que resulta del shock endotóxico inducido por LPS puede prevenirse principalmente por inhibición de la síntesis de TNF- α como consecuencia de la neutralización de IL-12. (Germann and Rude, 1995).

6.8 EFECTO DE IL-12 SOBRE TUMORES

El tratamiento sistémico con dosis relativamente elevadas de IL-12 puede suprimir el crecimiento y metástasis de ciertos tumores en varios modelos experimentales realizados *in vivo*.

Los eventos moleculares y celulares que median una respuesta antitumorogénica inducida por IL-12 son complejos. Mientras que en algunos modelos experimentales el efecto protector parece ser mediado por células TCD8⁺, las células NK son las principalmente responsables en otros modelos. (Germann and Rude, 1995).

6.9 REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y FUNCIÓN DE IL-12

A pesar de las evidencias que demuestran que IL-12 bajo ciertas circunstancias ejerce un efecto preventivo sobre las enfermedades autoinmunes, esta citoquina juega claramente un papel central promoviendo fenómenos autoinmunes e inflamatorios. Además, se ha convertido en una diana atractiva para el estudio de la modulación de la respuesta inmunológica. (Caspi, 1998). Incidir en los conocimientos acerca de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la producción y señalización de IL-12 proporcionarán gran ayuda en el diseño de estrategias que alteren varias etapas de la vía de actuación de IL-12 con el fin de modular las respuestas inmunes.

Las respuestas Th1 se relacionan con antígenos presentados por monocitos y células dendríticas, principales productores de IL-12. Contrariamente, antígenos presentados por células B, que producen poca o ninguna IL-12, tienden a inducir respuestas Th2 y a proteger contra enfermedades autoinmunes. (Saoudi y col., 1995; Conboy y col., 1997).

La interacción del receptor de CD40, expresado sobre células T, con el ligando CD40 (CD40L) expresado sobre células presentadoras de antígeno (APC), coestimula fuertemente la liberación de IL-12 por estas. Esta interacción CD40/CD40L parece tener central importancia en la inducción y mantenimiento de la autoinmunidad mediada por células, puesto que se ha demostrado la inhabilidad de ratones knockout para CD40L a desarrollar EAE. (Grewal y col., 1996). La posibilidad de interferir terapéuticamente con la vía de CD40 ha sido probado en los modelos murinos de EAE, EAU y CA, y en todos ellos se ha demostrado que bloqueando la interacción

CD40/CD40L aminoraba la enfermedad. CD40L también parece jugar un papel en algunos tipos de enfermedades autoinmunes sistémicas mediadas por anticuerpos. Se ha observado una expresión anormalmente elevada de CD40L sobre células B de ratones BXSB susceptibles al lupus y sobre células T de pacientes con SLE. La unión del CD40L expresado en linfocitos T con el receptor CD40 expresado en linfocitos B conduce a las células T a secretar IL-4, mientras que su unión con el CD40 expresado sobre macrófagos productores de IL-12 conduce a las células T a secretar IFN- γ . En presencia de IL-4, IL-12 actúa como un inductor de ambas células Th1 y Th2 y tiene un efecto adyuvante potente sobre la respuesta inmune humoral. (Schmitt y col., 1997).

IL-12 participa en un mecanismo de retroalimentación positiva promoviendo la secreción de IFN- γ que, a su vez, induce la producción de IL-12. (Yoshida y col., 1994).

La IL-10 es un potente inhibidor de la producción de IL-12. A su vez, la IL-12 induce la producción de IL-10 *in vivo* cuando es administrada a ratones y coestimula la secreción de IL-10 por células T humanas activadas *in vitro*. De manera que, esta capacidad que tiene la IL-12 de inducir IL-10 representa un mecanismo de retroalimentación negativo mediante el cual la IL-12 limita sus propios efectos (Tripp y col., 1993; D'Andrea y col., 1993). Ejemplo de este mecanismo los encontramos en los modelos de ratones deficientes en IL-10, estos desarrollan una colitis destructiva en respuesta a su propia flora intestinal, que se puede prevenir mediante el tratamiento con anticuerpos anti-IL-12. (Rennick y col., 1997). De esta forma, IL-10 constituye un mecanismo necesario y no redundante que controla respuestas dirigidas por IL-12. La capacidad bien conocida de IL-10 de antagonizar la producción de INF- γ a través de células NK y células T se debe

principalmente a que es capaz de inhibir la producción de IL-12 y en parte se debe a su habilidad de regular a la baja la expresión de moléculas coestimuladoras como B7.

Las interleuquinas IL-4 e IL-13 actúan como antagonistas de IL-12 y como se indica anteriormente en esta introducción, IL-4 sinergiza con IL-10 *in vivo* para conferir protección frente a enfermedades. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias IL-4 puede potenciar la producción de IL-12 dependiente de células T. Esto probablemente explica algunas observaciones donde IL-4 aumenta inesperadamente la autoinmunidad Th1-dependiente o revierte el beneficio de la terapia con IL-10. (Takenaka y col., 1997; Caspi, 1998). La IL-13 comparte varias características funcionales y estructurales con IL-4, sin embargo, a diferencia de IL-4, IL-13 es producida por ambos tipos celulares Th1 y Th2, su producción se prolonga hasta después de la activación celular, y la cantidad de IL-13 que se produce es de 10 veces más que la de IL-4 (de Vries, 1998). Elevados niveles de IL-13 se han detectado en el suero de pacientes afectados de esclerosis sistémica (una enfermedad mediada por células Th1) (Hasegawa y col., 1997) y en el lavado broncoalveolar de pacientes con asma (una enfermedad mediada por células Th2). (Huang y col., 1995).

Otro antagonista de la IL-12 es el TGF- β . Esta potente citoquina anti-inflamatoria inhibe la liberación de IL-12 por células humanas y murinas, previene la expresión de receptores de IL-12 de elevada afinidad, suprime el desarrollo de Th1 dirigido por IL-12, e inhibe la síntesis de INF- γ provocada por IL-12 a partir de NKs murinas. (Schmitt y col., 1997; Caspi, 1998). Por otro lado, está demostrado que la IL-12 suprime la producción de

TGF- β a través de un mecanismo al menos parcialmente dependiente de IFN- γ . (Gately y col., 1998; Watford y col., 2003).

Finalmente, un antagonista natural de IL-12 es el homodímero IL-12p40, este compite con el heterodímero p70 por la unión al receptor de IL-12, evitando la consiguiente respuesta biológica. El homodímero IL-12p40 antagoniza las funciones de IL-12 *in vitro* e *in vivo*. Además, la cadena p40 está sobre producida en relación a la cadena p35 por todos los tipos celulares que produce IL-12 y sus niveles permanecen elevados después de una estimulación, mientras que los niveles de p70 decaen rápidamente. Se ha demostrado que el tratamiento de ratones NOD con dímeros de IL12p40 previene la diabetes sesgando la respuesta diabeto génica desde un fenotipo Th1 hacia un fenotipo Th2. El efecto de este tipo de terapia permanece por determinar en otras enfermedades autoinmunes. (Gately and Mulqueen, 1996; Adorini and Trembleau, 1997).

Otra aproximación a la modificación de la señalización vía IL-12 implica la interferencia con moléculas específicas de la vía de transducción de señales de IL-12. Un ejemplo lo constituye la proteína STAT4, que, como se menciona anteriormente, se considera la proteína más específica en la vía de señalización de IL-12. (Jacobson y col., 1995). Se ha demostrado que en ratones con el gen STAT4 defectuoso desarrollan respuestas dependientes de IL-12 alteradas y aumentan la diferenciación de células Th2 debidas a un defecto en la señalización. (Kaplan y col., 1996).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Analizar el papel que juega la IL-12 en la regulación del balance entre células Th1 y Th2 en el modelo de enfermedad crónica de injerto contra el huésped inducido en ratones [BALB/c x A/J]F1 (=CAF1), mediante la inyección de células del bazo y ganglios linfáticos de ratones BALB/c, desarrollado previamente en nuestro laboratorio.
2. Estudiar la influencia de la IL-12 sobre el desarrollo de signos de artritis y glomerulonefritis en dicho modelo murino de enfermedad crónica de injerto contra el huésped (EICH) con un background BALB/c que puede desarrollar espontáneamente poli-artropatías inflamatorias crónicas semejantes a la artritis reumatoide del hombre y al que datos anteriores del laboratorio mostraron la aparición de signos de artritis y LES.
3. Analizar posibles mecanismos que protegen al huésped de la inducción de la forma aguda de la enfermedad de injerto contra el huésped en un modelo que presenta diferencias en antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II.
4. Analizar la capacidad de la IL-12 en incidir sobre el anidamiento de células donantes en los tejidos hematopoyéticos del huésped.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS DE RATONES

Se han utilizado ratones hembras libres de patógenos de la cepa BALB/c y del híbrido (BALB/c x A/J)F1, CAF1, de edades comprendidas entre 8 y 14 semanas, procedentes de los laboratorios IffaCredo y Jackson, respectivamente. En la tabla 2 se muestra la distribución de alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y MIs de estas cepas.

Tabla 2

Cepa	Haplotipo	H-2						MIs	
		K	B	Aa	Eb	Ea	D	1	2
BALB/c	d	d	d	d	d	d	d	b	a
A/J	a	k	k	k	k	k	d	b	a
CAF1	a/d	k/d	k/d	k/d	k/d	k/d	d	b	a

Todos estos animales se han mantenido en nuestro departamento de estabulación en las condiciones habituales de higiene, distribuidos individualmente. La temperatura ambiental se mantuvo a $20 \pm 1^\circ \text{C}$. La composición del pienso se detalla en la Tabla 3.

En ninguna de estas cepas se ha descrito la aparición de lesiones autoinmunes espontáneas a la edad de 1 año.

Tabla 3: Composición del pienso VAR-A-04 (Comercial Pan-Lab)

Almidón	43,3%
Proteína bruta	17,62
Grasa bruta	2,50%
Celulosa	4,05%
Cenizas	4,38%
Calcio	0,66%
Fósforo	0,49%
Humedad	10,54%
Sodio	0,14%
Lisina	0,85%

2. INDUCCIÓN DE EICH EN EL MODELO EXPERIMENTAL: BALB/c [BALB/c X A/J]F1 (CAF1)

La inducción de la EICH en el modelo murino experimental BALB/c CAF1 se consigue mediante dos administraciones por vía intravenosa, los días 1 y 5, de células inmunocompetentes de bazo y ganglio linfático de animales de la cepa donante BALB/c a ratones de la cepa receptora [Balb/c x A/J]F1 (CAF1).

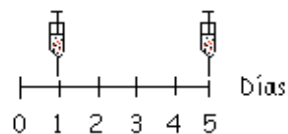
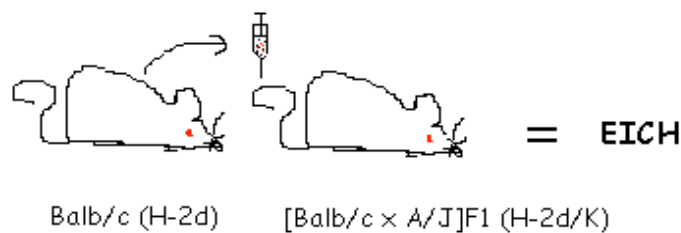


Figura 4



2.1 OBTENCIÓN DEL INJERTO

Protocolo de obtención del injerto:

- a) Para la obtención de células donantes, se sacrificaron dos ratones Balb/c por cada receptor CAF1 por dislocación cervical y se desinfectaron por inmersión en baños sucesivos de alcohol yodado, alcohol de 70° C y suero fisiológico estéril.

- b) Se extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos submandibulares, torácicos y axilares en condiciones estériles (en cámara de flujo laminar), y se transfirieron a placas de petri que contenían PBS 1X estéril suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% Penicilina/Estreptomicina (Antibióticos S.A.).
- c) Para la obtención de células del bazo, se practicó una incisión en un extremo del mismo de manera que haciendo un barrido longitudinalmente con dos asas formadas con agujas de insulina las células salieron hasta quedar la cápsula vacía separada. La suspensión celular, previamente disgregada con la ayuda de pipeta Pasteur se transfirió a tubos estériles de 10 ml y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min y a 4° C.
- d) El sobrenadante se eliminó y el botón celular se lavó una vez con suero fisiológico suplementado con antibióticos, centrifugando en las mismas condiciones.
- e) A continuación, se lisaron los hematíes contenidos en esta suspensión celular mediante la resuspensión del precipitado de células en 3 ml de una solución de lisis estéril:
- | |
|-----------------------|
| 10 ml Tris 0.17M |
| 90 ml Cloruro Amónico |
| (pH 7.2) |
- f) Después de centrifugar de nuevo igual que anteriormente, se lavaron las células dos veces con suero fisiológico suplementado con antibióticos.

- g) Tras decantar el sobrenadante del último lavado, se resuspendió el precipitado con 3 ml de suero fisiológico suplementado con antibióticos y, después de filtrar el contenido mediante una columna de lana de vidrio, se analizó la viabilidad celular.

- h) Para obtener las células de los ganglios linfáticos, se trituraron estos con un homogeneizador de 5 ml de capacidad en suero fisiológico suplementado con antibióticos. A continuación, se procedió de la misma manera que para la obtención de la suspensión celular del bazo.

- i) Finalmente, se mezclaron las dos suspensiones celulares de bazo y ganglios y se ajustó la suspensión resultante a un volumen determinado de suero fisiológico suplementado con antibióticos de manera que cada animal receptor recibió por vía intravenosa un total de 2×10^7 células ganglionares y 7×10^7 células del bazo en un volumen final de 50 μ l, 30 min después de la inyección intraperitoneal de 50 U.I. de heparina sódica Rovi.

2.2 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR

En tubos de 1 ml de capacidad, se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión celular y de azul tripán (solución stock 1 mg/ml en suero fisiológico). Después de unos minutos de incubación se dispuso una alícuota sobre una cámara de contaje (Glasstic Slide 10) y se contó la viabilidad en un microscopio óptico. Las células teñidas corresponden a las muertas y en todos los casos, la viabilidad de las células osciló entre 85-95%.

3. TRATAMIENTO CON INTERLEUQUINAS

3.1 TRATAMIENTO CON rmIL-12

Los animales recibieron una dosis final de 2 μg (5500 Unidades) de IL-12 murina recombinante (rmIL-12) (proporcionada por Genetics Institute, Cambridge, MA) (actividad específica $2,75 \times 10^6$ U/mg), disuelta en un volumen de 50 μl , en suero fisiológico con 1% de suero murino CAF1, y administrada antes de la inyección de células semialogénicas por vía intraperitoneal.

Se seleccionaron 2 protocolos de administración: a) de forma fraccionada, durante 5 días desde la primera hasta la segunda inyección de células semialogénicas, o bien, b) en una única administración, 1 hora antes de la primera inyección de células semialogénicas. (Figura 5).

Las pautas y dosis de administración se seleccionaron según datos bibliográficos (Sykes y col., 1995; Dey y col., 1998) y en base a estudios preliminares que mostraron una mortalidad del 100% (4/4) de los animales antes de 15 días de la inducción de la EICH al incrementar la dosis de IL-12 a 2,47 μg . (6800 U).

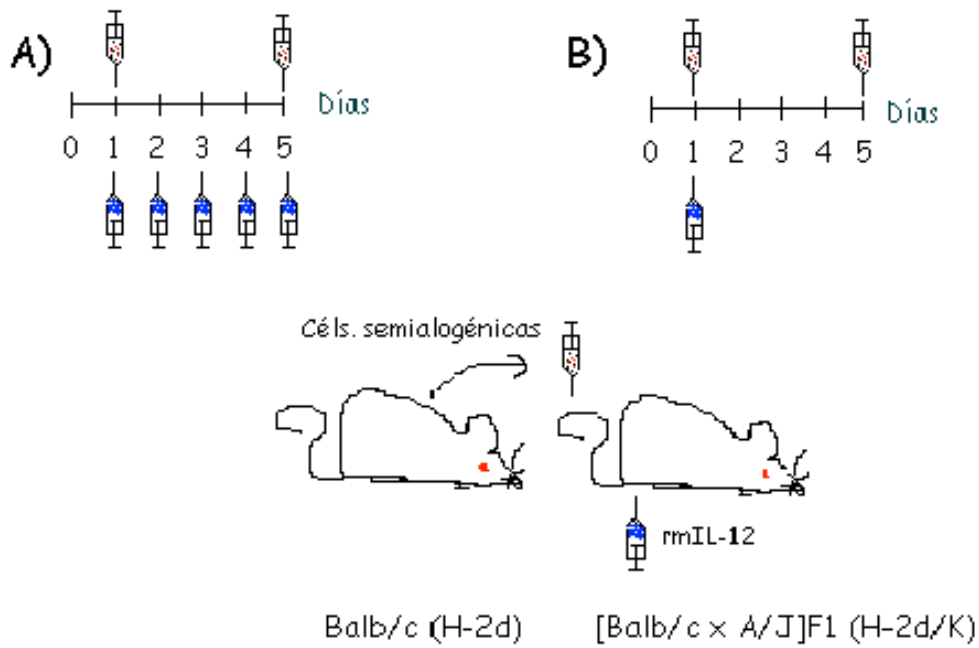


Figura 5

No existen diferencias en el efecto que la IL-12 ejerce sobre la polarización Th1/Th2 entre dosis de IL-12 que varían de 330 a 5500 U, o entre administrar la IL-12 de 1 a 60 min antes de la inyección del antígeno o células alogénicas, según datos bibliográficos (Sykes y col., 1999; Dey y col., 1998), o entre administrar la IL-12 (entre 4900 U y 6500 U) de forma fraccionada o en una única dosis, según nuestra experiencia en el modelo CAF1+BALB/c.

3.2 TRATAMIENTO CON rmIL-4

Empleamos una dosis final de 7500 ng de rmIL-4 (R&D systems, Endogen) (actividad específica: ED50= 1-2 ng/ml), administrada de forma fraccionada a razón de tres inyecciones al día durante 5 días, entre la primera y segunda administración de células semialogénicas, según protocolo descrito en la bibliografía (Fowler y col., 1994).

4. GRUPOS DE ESTUDIO

4.1 MODELOS EXPERIMENTALES DE EICH

Modelo 1: 41 ratones hembras CAF1 de edades comprendidas entre 8 y 14 semanas se utilizaron como receptores de células semialogénicas procedentes de ratones hembras de la cepa donante BALB/c:

7 animales fueron sacrificados a los 2 días de evolución de la enfermedad.

5 animales fueron sacrificados a los 4 días de evolución de la enfermedad.

5 animales fueron sacrificados a los 7 días de evolución de la enfermedad.

4 animales fueron sacrificados a los 10 días de evolución de la enfermedad.

y 20 animales fueron sacrificados a los 5-6 meses de evolución de la enfermedad.

Modelo 2: 42 ratones hembras CAF1, receptores de células semialogénicas procedentes de ratones hembras de la cepa donante BALB/c, de la misma

edad que el modelo anterior, fueron tratados con 2 μg (5500 U) de rmIL-12. De este grupo:

23 ratones recibieron rmIL-12 de forma fraccionada a razón de 0.4 μg de IL-12/día durante 5 días consecutivos entre la primera y segunda administración de células semialogénicas, por vía intraperitoneal.

9 animales de este grupo fueron sacrificados a los 2 días de evolución de la enfermedad.

5 animales fueron sacrificados a los 4 días de evolución de la enfermedad.

5 animales fueron sacrificados a los 7 días de evolución de la enfermedad.

4 animales fueron sacrificados a los 10 días de evolución de la enfermedad.

19 ratones recibieron IL-12 en una única dosis por vía intraperitoneal 1 hora antes de la primera administración de células semialogénicas. Este grupo de animales fue sacrificado a los 5-6 meses de evolución de la enfermedad.

4.2 GRUPOS CONTROL

Control 1: Como grupo control de la inducción de una respuesta Th-2, 6 ratones hembras CAF1 fueron receptores de células semialogénicas de ratones hembras de la cepa donante BALB/c y fueron tratados con 7500 ng de IL-4 suministrada por vía intraperitoneal de forma fraccionada a razón de 3 inyecciones/día durante 5 días, entre la primera y segunda administración de células semialogénicas, de la misma edad, sexo que los

animales de los modelos anteriores, y sacrificados a los 3-5 meses después de la administración de células donantes.

Control 2: 8 animales CAF1 que recibieron estímulo singénico con células linfoides de la cepa CAF1 los días 1 y 5, de la misma edad y sexo que los individuos de los modelos anteriores, sacrificados entre los 5-6 meses de evolución de la enfermedad después de obtener semanalmente muestras de sangre de los mismos.

Control 3: 8 animales CAF1 que recibieron estímulo singénico los días 1 y 5 y fueron tratados con 2 µg de IL-12 suministrada en una única dosis por vía intraperitoneal 1 hora antes de la primera administración de células semialogénicas, de la misma edad y sexo que los individuos de los modelos anteriores, sangrados semanalmente y sacrificados entre los 5-6 meses de evolución de la enfermedad.

Control 4: 24 animales CAF1 que no recibieron ningún estímulo ni tratamiento previo, de la misma edad, sexo que los animales con enfermedad de ICH.

La siguiente tabla resume de forma esquemática todos los grupos analizados en este estudio mencionados anteriormente.

Tabla 4

Grupos de estudio	N ^o Animales	Cepa Receptora	Cepa Donante	Tratamiento administrado
Modelo 1	41	CAF1	BALB/c	-
Modelo 2	42	CAF1	BALB/c	rmIL12
Control 1	6	CAF1	BALB/c	rmIL4
Control 2	8	CAF1	CAF1	-
Control 3	8	CAF1	CAF1	rmIL-12
Control 4	24	CAF1	-	-

5. ESTUDIOS CLÍNICOS

Todos los animales a los que se les indujo la reacción del ICH y todos los animales de los grupos control, tratados o no con citoquinas, que fueron sacrificados a largo plazo, se examinaron semanalmente a partir de la segunda administración de células donantes hasta el momento de sacrificarlos. De todos ellos se valoraron los parámetros clínicos: lesiones de piel (vasculitis, alopecias y áreas de esclerosis), signos inflamatorios articulares y, presencia de proteínas en la orina mediante el test comercial de Combur (Boehringer Mannheim).

También con igual periodicidad se sangraron por el plexo retroorbital, para la obtención de muestras del plasma, obteniéndose la primera sangría (sangría a t=0) antes de la inducción de la enfermedad. La extracción de sangre se realizó utilizando pipetas Pasteur estiradas y esterilizadas por

autoclavado y se recogió en tubos de plástico heparinizados. El plasma se separó mediante dos centrifugaciones de 10 min cada una a 2000 rpm a temperatura ambiente y se guardó a -20°C hasta su análisis.

6. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

6.1 OBTENCIÓN DE TEJIDOS

En el momento de la autopsia de los animales en estudio, se extrajeron: las 4 extremidades, el bazo, el timo, muestras de hígado y de riñón y 2-4 ganglios linfáticos. En algunos casos la elección del momento de sacrificio se vio condicionada por la gravedad de la enfermedad que manifestaba el animal.

Proceso de la autopsia:

Las 4 extremidades fueron fijadas con una solución de formol al 10% en agua destilada, posteriormente fueron descalcificadas y después se incluyeron en bloques de parafina que se guardaron a temperatura ambiente hasta el momento de ser procesados para el estudio histológico mediante la tinción de hematoxilina-eosina.

Las muestras de timo y bazo se dividieron en 2: una muestra se utilizó para obtener una suspensión de células tímicas y de esplenocitos, respectivamente, siguiendo la misma metodología que se describe en el apartado 2.1 para la obtención de células de ganglio linfático y bazo, respectivamente. Estas suspensiones celulares se emplearon para los

estudios de las subpoblaciones linfocitarias y niveles de quimerismo, mediante citometría de flujo y, en el caso del bazo, para la valoración de los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos, mediante la técnica de ELISA. La segunda muestra de ambos tejidos se congeló directamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para el análisis del ARNm de diversas citoquinas mediante la técnica de ensayo de protección contra RNasas.

Las muestras de hígado, riñón y los ganglios linfáticos se trocearon con bisturí en pequeños fragmentos que agrupados en bloques de tres, un fragmento de cada tipo tisular, utilizando OCT como medio de inclusión, se congelaron en nitrógeno líquido. Finalmente las piezas se guardaron a -80°C hasta el momento de la realización del estudio histológico (mediante la tinción de hematoxilina-eosina) y la realización del estudio inmunológico (mediante la técnica de inmunofluorescencia directa).

6.2 TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Los bloques de tejidos formados a partir de fragmentos de hígado, riñón y ganglios que habían sido congelados en platinas con nitrógeno líquido y guardados a -80°C , se cortaron en un criostato Leitz a $4\ \mu\text{m}$ de grosor. Los cortes se recogieron desde la cuchilla del criostato con un portaobjeto. Algunos cortes criostáticos sirvieron para el estudio inmunológico y fueron tratados tal y como se describe en el apartado 5.2.3, y otros se tiñeron con hematoxilina-eosina para el estudio histológico tal y como indica el siguiente protocolo:

- a) Se hidrataron los cortes tisulares sumergiendo los portaobjetos en baños sucesivos de xilol, etanol absoluto, etanol de 70° C y agua corriente, durante 5 min cada lavado.
- b) A continuación, se tiñeron sumergiendo los portaobjetos en una solución acuosa de hematoxilina de Harris (Merck) por espacio de 5 min.
- c) Después de lavar los portaobjetos durante 10 min con agua corriente, para eliminar el exceso de hematoxilina de Harris, se tiñeron con una solución de Eosina (Merck) preparada al 1% en alcohol de 35° C.
- d) Se lavaron y deshidrataron las muestras sumergiendo los portaobjetos en baños sucesivos de etanol de 70° C, etanol absoluto y xilol, durante 5 min cada lavado.
- e) Finalmente, se montaron las preparaciones depositando sobre la muestra una gota de resina DPX-Ex.LI, y a continuación el cubreobjeto, para su posterior observación al microscopio Zeiss Axiuscop, equipado con fuente lumínica y ultravioleta y con equipo de fotografía digital cámara Spot RT.

A partir de los bloques de parafina que contenían las extremidades, se realizaron cortes de 4-7 μm de grosor con un micrótomo Leitz. Estos cortes se incubaron en un baño de agua a 60° C y de allí se recogieron directamente con portaobjetos. A continuación, se procedió a la tinción con hematoxilina-eosina como se describe en el párrafo anterior. (Ensayo

realizado por la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la UAB).

6.3 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

Los cortes criostáticos destinados al estudio inmunológico fueron tratados como indica el siguiente protocolo:

- a) Se fijó la muestra sumergiendo los portaobjetos en acetona (Merck) durante 3 min.
- b) Se secaron los portaobjetos con la ayuda de un secador de mano y a continuación se lavaron con solución tamponada (PBS: 0.15M NaCl (Merck puris.), 0.5 M fosfato sódico (Merk puris.) pH 7.4) durante 10 min.
- c) Se incubaron con anticuerpos purificados de conejo, anti-inmunoglobulinas de ratón marcados con fluoresceína (DAKO) diluidos 1/20 en PBS X1, durante 20 min.
- d) Se lavaron los portaobjetos de nuevo con PBS X1 durante 20 min, realizando cuatro cambios.
- e) Finalmente, se montaron los portaobjetos depositando una gota de glicerol tamponado (Bio-Merieux) sobre el corte y a continuación un cubreobjeto. Para el análisis de los resultados se utilizó un microscopio Zeiss Axioskop de fluorescencia.

7. ESTUDIOS SEROLÓGICOS

7.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANAS) POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) SOBRE TEJIDOS DE RATA.

7.1.1 Preparación de los tejidos

- a) De una rata recién sacrificada por dislocación cervical, se extrajeron el hígado, los riñones, el estómago y el timo.

- b) Sobre una superficie húmeda en PBS 1x, se trocearon con bisturí en fragmentos de 2 a 4 mm de arista, y se formaron bloques juntando un trozo de cada tipo tisular sobre un pedazo de cartulina del mismo tamaño que contenía una gota de resina Tissue-Tek OCT 4583 (Sakura Finetechnical Co.) como medio de inclusión. PBS (pH 7.4):

0.5 M Fosfato sódico

150 mM NaCl

- c) Inmediatamente después, se congelaron los bloques tisulares en nitrógeno líquido durante 2 min y se guardaron a $-80^{\circ} C$ hasta el momento de utilizarlos.

- d) Se realizaron cortes de 4 μm de grosor en un criostato (Leitz), que se recogieron, desde la cuchilla del criostato, con portaobjetos

desengrasados. Los cortes resultantes se guardaron a $-40^{\circ} C$ hasta el momento de estudiarlos.

7.1.2 Técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre rata.

- a) Se fijaron los cortes criostáticos sumergiendo los portaobjetos en una cubeta con el fijador PLP durante 10 min a t.a..

<u>PLP (pH 7-4):</u>	0.5% Paraformaldehido (Fluka)
	10 mM Periodato sódico (Merck)
	75 mM Lisina-HCl (Merck)
	37 mM Fosfato Na (Merck)

- b) Después, se lavaron X1 con PBS 1X durante 10 min. a t.a..
- c) Sin dejar secar en ningún momento la muestra, después de secar las zonas de los portas entre los diferentes cortes de tejido, se incubaron con 40 μ l de cada uno de los sueros de los animales en estudio, diluidos 1/20 con PBS 1X, durante 20 min en cámara húmeda a t.a.
- d) Se lavaron las preparaciones con PBS 1X durante 20 min., realizando tres cambios de la solución de lavado.
- e) A continuación, se incubaron con 40 μ l de una solución 1/20 de IgG de conejo anti-Igs de ratón marcadas con FITC (Dako) en PBS 1X, durante 20 min en cámara húmeda, a t.a..

f) Se lavaron de nuevo con PBS 1X durante 20 min con tres cambios de solución de lavado.

g) Finalmente, se montaron las preparaciones depositando una gota de glicerina tamponada a pH 7.2 sobre cada corte criostático y a continuación un cubreobjeto, y se procedió a su lectura en un microscopio de fluorescencia (Microscopio Zeiss Axioskop).

7.2 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIFILAGRINA (AFA) POR INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA (IFI) SOBRE ESÓFAGO DE RATA.

Se procedió como indica el protocolo anterior (apartado 7.1.2), empleando como substrato cortes criostáticos de 4 μ m del tercio medio de esófago de rata.

7.3 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-RIBONUCLEOPROTEÍNAS POR INMUNOPRECIPITACIÓN DE ARNS.

Es una de las técnicas más sensibles para el aislamiento y caracterización de antígenos celulares asociados a ARNs de pequeño tamaño (ribonucleoproteínas) Se basa en la utilización de componentes celulares marcados metabólicamente con ^{32}P , como fuente del antígeno (Kessler, 1975). La utilización de proteína A de *Staphylococcus* unida a Sepharosa CL-4B, ha permitido aislar rápidamente por sedimentación el precipitado de antígeno-anticuerpo en el caso de anticuerpos capaces de reaccionar con la

Proteína A. En el caso de anticuerpos pertenecientes a una clase de inmunoglobulina incapaz de unirse a la proteína A o cuando la cantidad de antígeno es insuficiente para que se forme un precipitado adecuado, la reacción del antígeno y el anticuerpo tiene lugar en presencia de anti-Igs (anti-ratón en nuestros estudios) capaces de reaccionar con los anticuerpos y de unirse a la Proteína A.

Mediante la identificación electroforética de las moléculas de ARN inmunoprecipitadas (Lerner and Steitz, 1979) se puede determinar la presencia de anticuerpos dirigidos a antígenos ribonucleoprotéicos tanto nucleares (snRNP) como citoplasmáticas (scRNP). En general, los epítomos en cada una de estas partículas de ribonucleoproteínas reside sobre una o más de las proteínas asociadas, mientras que los componentes de ARN proporcionan la base para su identificación electroforética. También se han descrito anticuerpos que reconocen la estructura de ARN desproteínizado.

Para la realización de estas técnicas, así como las de RPA que se detallan más adelante, fue necesario tomar una serie de precauciones para evitar la contaminación con RNasas:

Se trabajó con guantes en todos los pasos de manipulación de muestras, material y soluciones.

El agua utilizada para preparar las soluciones fue previamente tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma) al 0.1% durante toda la noche y después esterilizada por autoclave (30 min, 121° C y 1.2 atm) para quitar las trazas de DEPC.

Todas las soluciones se prepararon con reactivos de alto grado de pureza, reservados para trabajar con ARN, y con agua tratada con DEPC, y fueron esterilizados por autoclave antes de utilizarlos, excepto en el caso de aquellas soluciones lábiles a este proceso de esterilización que fueron esterilizadas por filtración con filtros de 0.22 μm de diámetro de poro (Millex-GP, Millipore).

Se ha empleado material disponible comercialmente estéril y libre de RNasas. El material de plástico fue lavado con cloroformo y después con abundante agua DEPC. Las pipetas Pasteur y los tubos córex fueron silanizados con diclorometilsilane (Sigmacote, Sigma), antes de autoclavarlo. (Sambrook and Gething, 1989). Los vidrios para la formación del gel de poliacrilamida, después de tratarlos con silane fueron horneados a 180° C durante 1h.

7.3.1 Preparación del cultivo celular.

Como substrato para el estudio de los anticuerpos antinucleares se empleó la línea celular humana HeLa S₃ (carcinoma de cérvix, proporcionada por la ATCC).

- a) Se cultivaron las células en suspensión, en frascos de vidrio Belco preparados para cultivos en agitación magnética, a la concentración de $2-4 \times 10^5$ cél/ml en medio de cultivo completo, a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad.

Medio de cultivo completo:

500 ml RPMI-1640 (Bio Whittaker)
10% suero de ternera fetal (FCS) (Bio Whittaker)
1% Glutamina (Bio Whittaker)
100 µg/ml Penicilina (Bio Whittaker)
100 µg/ml Streptomycin (Bio Whittaker)

7.3.2 Marcaje metabólico de las células con ^{32}P i.

- b) Las células en cultivo se ajustaron a una concentración final de $2-4 \times 10^5$ cél/ml en un volumen final de 10 ml/muestra.
- c) Se repartió el volumen de células necesario en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 2000 rpm/3 min/4° C (centrífuga IEC Centra GP8, rotor 216).
- d) El precipitado de células se lavó X1 con medio de cultivo sin fosfatos (RPMI-1640 sin fósforo y sin glutamina. Biological Industries) y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores.
- e) El precipitado se resuspendió en el volumen inicial con medio de cultivo sin fósforo suplementado con 10% FCS (previamente dializado frente a suero fisiológico durante 48h/4° C y filtrado con filtros 0.22 µm de diámetro de poro) y glutamina al 1%.

- f) Se añadió 0.1 mCi/muestra de ^{32}Pi (ortofosfato en solución acuosa, libre de HCl. Amersham Pharmacia Biotech) al cultivo celular y se incubó durante 12-14h / 37° C / 5% Co₂ / 90% humedad.

7.3.3 Preparación del extracto celular.

- g) Se recogieron las células marcadas por centrifugación a 2000 rpm, durante 10 min. a 4° C.
- h) Se decantó el sobrenadante y se lavó el botón celular con tampón TBS frío.

<u>TBS (pH7.4):</u>	150 mM NaCl (Merck)
	10 mM Tris-HCl (Merck)

- i) Después de centrifugar en las condiciones anteriores, se decantó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado de células en 1 ml de tampón NET-2 por cada 100 ml de células en un tubo córex, y se añadió 1 µl RNAsin (Amersham)//ml de NET-2.

<u>NET-2 (pH 7.4):</u>	50 mM Tris-HCl (Merck)
	150 mM NaCl
	0.05% Nonidet P-40 (Fluka)

- j) La suspensión celular se sonicó (sonicador Brawn) X3, con intervalos de 20 seg, a 65 W de frecuencia, durante 40 seg, manteniendo las células en hielo durante todo el proceso de sonicación.

- k) La suspensión sonicada se centrifugó a 10000 rpm / 20min / 4° C (centrífuga Beckman , rotor J-21), con el fin de separar el extracto del resto de material insoluble.

- l) El sobrenadante se recuperó como fuente de antígenos y se eliminó el precipitado.

- m) Con el fin de eliminar del extracto todo aquello que posteriormente podría unirse de manera inespecífica a las partículas de proteína A-Sepharosa-suero problema, se incubó el sobrenadante con un volumen 20 veces inferior al del extracto, de proteína A-Sepharosa unida a suero de ratón normal, durante 2 h en rotación continua a 4° C.

- n) Acabada la incubación, se centrifugó el extracto durante 10 min a 2500 rpm y se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Este sobrenadante constituye la fuente de antígeno.

7.3.4 Preparación de las muestras para IP.

- a) Se preparó una suspensión de proteína A-Sepharosa (Amersham Pharmacia Biotech) a una concentración de 4 mg/ ml/ muestra con IPP.

<u>IPP (pH 8):</u>	500 mM NaCl
	10 mM Tris-HCl
	0.1% Nonidet P-40

- b) Previamente a la incubación con los sueros a estudiar, se incubó la proteína A-Sepharosa con 10 μ l/muestra de Igs de coneja anti-Igs de ratón (Dako), durante 2 h rotando a temperatura ambiente.
- c) Se recuperó la proteína A-Sepharosa-Igs de conejo anti-Igs de ratón centrifugando brevemente la suspensión a 3000 rpm, a temperatura ambiente, y se retiró el sobrenadante con mucho cuidado (Centrífuga IEC Centra GP8, rotor 216).
- d) Se lavó X3 las partículas con IPP, recuperándolas por centrifugación siguiendo las condiciones anteriores.
- e) Finalmente, se resuspendieron las partículas de proteína A-Sepharosa-Igs de conejo anti-Igs de ratón en tampón IPP a la concentración inicial de 4 mg/ml.

- f) La suspensión de proteína A-Sepharosa-anti-Igs se distribuyó en microtubos de 1.5 ml autoclavados, 500 μ l de esta suspensión más 10 μ l de los sueros problemas.
- g) La mezcla se incubó durante toda la noche a 4° C, agitando por rotación.
- h) Después de la incubación, se centrifugaron los tubos en microfuga a 13000 rpm durante 10 s, y se retiraron los sobrenadantes con mucho cuidado de no arrastrar partículas de sepharosa.
- i) Se lavaron las muestras añadiendo 500 μ l de tampón IPP a cada una de ellas, agitando con vórtex suave y brevemente. Las partículas se recuperaron por centrifugación a 13000 rpm durante 10 s. Se repitió este lavado dos veces más.
- j) Se hizo un lavado adicional con TBS y se añadió a cada muestra 500 μ l de una solución de albúmina bovina (BSA) (Sigma) 1mg/ml en TBS, previamente filtrada (Millex-HA, 0.45 μ m, Millipore). Se incubó durante 45 min a 4° C, con el fin de evitar posteriores uniones inespecíficas del extracto a la proteína A-Sepharosa-anti-Igs murinas-suero problema.
- k) Se lavaron a continuación las diferentes muestras X3 con TBS siguiendo las condiciones descritas en el apartado i).

- l) Se resuspendieron las muestras en 400 μ l de NET-2 y se añadió a cada una de ellas 100 μ l del extracto marcado. Se incubaron en rotación durante 2 h a 4° C.
- m) Al finalizar la incubación, se lavaron X3 los complejos antígeno-anticuerpo unidos a la proteína A-Sepharosa con tampón NET-2 siguiendo las condiciones descritas en el apartado i).

En todos los experimentos se preparó una muestra control de los ácidos nucleicos contenidos en 6 μ l de extracto total, que fue sometida al mismo procedimiento de extracción, que se describe a continuación.

7.3.5 Extracción y estudio de los ácidos nucleicos precipitados.

- a) A cada precipitado que contiene las partículas de proteína A-Sepharosa con los complejos se añadió:

300 μ l de NET-2
15 μ l de 20% SDS (Bio Rad)
30 μ l de acetato sódico
2 μ l de ARNt carrier (10mg/ml) (Sigma)
300 μ l de PCA (50 Fenol (Fisher): 50 Cloroformo (Merck):1 Alcohol isoamílico (Merck))

- b) Se agitaron energicamente con vórtex cada una de las muestras, hasta obtener una emulsión blanquecina.

- c) Se centrifugaron los tubos en microfuga durante 5 min a 13000 rpm. El resultado es la formación de tres fases perfectamente separadas.
- d) Se extrajo la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos extraídos con pipeta Pasteur silanizada, y se transfirió a nuevos tubos eppendorfs. Se añadieron de 2,5 a 3 volúmenes de etanol absoluto por volumen de solución de ácidos nucleicos.
- e) Se agitaron los tubos por inmersión y se dejó precipitar los ácidos nucleicos durante 30 min a -80°C o bien toda la noche a -20°C .
- f) Mediante centrifugación en microfuga durante 15 min, a 13000 rpm y a 4°C , se recuperaron los ácidos nucleicos y se lavaron una vez con $500\ \mu\text{l}$ de etanol al 70%.
- g) Después de centrifugar de nuevo tal y como se indica en el apartado f), se decantaron los sobrenadantes y se secaron los precipitados al vacío (Vacustation, Virtis).
- h) Se disolvió el residuo seco de cada tubo con ayuda del vórtex en $20\ \mu\text{l}$ de tampón de muestra.

Tampón de muestra en TBE: | 10 mM Urea
| 0.025% Azul de bromofenol
| 0.025% Xylene cianol

TBE (pH 8.3): | 90mM Tris
| 90 mM Ácido bórico (H_3BO_3)
| 10mM EDTA

- i) Se calentó cada muestra disuelta, durante 3min a 65° C, se centrifugó a 13000 rpm durante 2 s, y a continuación se sometió a carrera electroforética.

7.3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante para el análisis de los ácidos nucleicos.

- a) Los geles de poliacrilamida se utilizan para analizar ARNs y fragmentos de ADN de pequeño tamaño (<1kb) por desplazamiento en campo eléctrico en condiciones desnaturalizantes de urea.
- b) Se lavó un juego de cristales para geles (>40 cm de largo) con abundante agua seguido de etanol. Se silanizó el cristal más pequeño, se lavó de nuevo y se ensambló el molde para el gel (0.4 mm espaciadores).
- c) Para el análisis de los snARN y scARNs inmunoprecipitados, se prepararon geles de poliacrilamida al 10% que contienen 7M de urea.

Solución madre
de acrilamida 30%:

30 g Acrilamida
1.13 g Bisacrilamida
agua destilada hasta 100 ml

Gel al 10%: 42 g Urea
10 ml TBE 10X
33 ml de solución madre de acrilamida al 30 %
agua bidestilada hasta 100 ml.

- d) Después de filtrar la solución de acrilamida a través de un filtro de 0.45 μm de diámetro de poro, se añadieron 600 μl de una solución de persulfato amónico al 10% y 60 μl de TEMED (Bio Rad), se vertió la mezcla en un molde formado por dos vidrios (35 x 40 x 0.07 cm) separados por dos espaciadores de 0.07 cm de grosor y se añadió el peine apropiado para la aplicación de las muestras (pocillos de 5 mm de ancho) y se dejó polimerizar la poliacrilamida durante 1 h a t.a..
- e) A continuación, se llevó a cabo la electroforesis durante aproximadamente 12 h a 500 V en tampón de carrera TBE 1X. En estas condiciones el xylene cianol se destaca como una banda de color azul claro situada a unos 10 cm del final del gel. Este colorante es, además de un indicador de carrera, un marcador de migración de tamaños determinados de nucleótidos según el porcentaje del gel que se utilice. En geles del 10% el azul de bromofenol migra con los fragmentos de ácidos nucleicos de 32 nucleótidos de longitud, y el xylene cianol migra con tamaños de 115 nucleótidos.
- f) Finalizada la electroforesis, se colocó el gel sobre una hoja de papel Whatman, encima del gel se colocó papel de celofan, y se dejó secar al vacío durante 2 h a 80° C en un secador de geles (Bio-Rad). A continuación, se colocó encima de una película XRP-5 para auto-

radiografía (Kodak) y se introdujo el conjunto en un cassette de radiografías y se guardó en un congelador a -80° C. En nuestros experimentos los tiempos de exposición han sido entre 12 y 24 h para exposiciones cortas y de 3 días para exposiciones largas.

7.4 TÉCNICAS DE ENZIMOINMUNOENSAYO

Los enzimoinmunoensayos (EIAs) se pueden definir como técnicas inmunológicas en las que la reacción antígeno (Ag) anticuerpo (AC) se detecta mediante el empleo de reacciones enzimáticas proporcionadas por la reacción de una enzima unida a un Ac secundario que reconocería el compuesto Ig del complejo Ag-Ac.

A las moléculas de Ag o Ac se le puede unir una enzima sin que pierdan ninguna de sus propiedades inmunológicas específicas. A estas preparaciones se les denomina conjugado. Cuando un Ag reacciona con su conjugado se forma un complejo, Ag-Ac conjugado, que al añadir un substrato específico para la enzima, se origina un producto que en algunos casos es coloreado, el cual se puede medir en un espectrofotómetro.

El término ELISA identifica un ensayo enzimático que se realiza sobre un soporte sólido. Hay muchos materiales que pueden usarse como inmunoabsorbentes para el Ag o Ac. Uno de los más empleados son placas de plástico de microtitulación (microtitter Nunc) de 96 pocillos ideales para ensayar gran número de muestras.

7.4.1 Determinación de anticuerpos anti-ADN de doble cadena (anti-ADNdc)

Para la valoración de la producción de anticuerpos anti-ADNdc se empleó la técnica de ELISA indirecto.

- a) Se empleó como fuente de antígeno, ADN plasmídico (plásmido PBR 322. Boehringer Mannheim). Debido al bajo rendimiento de unión del plásmido a las placas de microtitulación Nunk, estas se recubrieron previamente con 50 μ l de una solución acuosa 0.01% de poli-L-Lisina (Sigma) durante 1 h a t.a., como medio de unión del ADN al plástico.
- b) Después de descartar la solución, se lavaron las placas X3 con tampón TE.

TE: (pH 8): | 10mM Tris-HCl
 | 1 mM EDTA

- c) Se dispensaron 100 μ l de una solución de ADNdc en tampón TE a la concentración de 50 μ g/ml, por espacio de 1 h a t.a.
- d) Se descartó la solución y se lavaron X1 las placas con el tampón TE.
- e) Se bloquearon las placas sensibilizadas con ADN durante 1 h a t.a. con 200 μ l/pocillo de Tampón de bloqueo 10% FCS/1 M Tris-Hcl.

f) Posteriormente, se lavaron X5 con tampón A (pH 7.4):

<u>Tampón A (pH 7.4):</u>	0.1 M Tris-HCl
	1% FCS
	0.05 % Tritón X-100

g) Se añadieron 100 μ l/pocillo de una dilución 1/200 en tampón A de los sueros a estudiar y controles negativos y positivos (todos estos por duplicado), y se incubaron durante 1 h a t.a.

h) Después de la incubación y de lavar X5 las placas con tampón A, se incubaron con 100 μ l/pocillo de una dilución 1/2000 de anti-IgG de ratón purificado (de rata) marcado con peroxidasa (Caltag), en tampón A, durante 1 h a t.a.

i) Se lavaron X5 las placas con tampón A y X1 con 0.1 M Tris-HCl pH 7.4.

j) Se incubaron con 200 μ l/pocillo del substrato de la peroxidasa, ortofenil-diamina (Sigma), durante 30 min en la oscuridad.

k) Después de parar la reacción con 50 μ l/pocillo de una solución de ácido sulfúrico al 25% (Merck), se realizó una lectura a 492 nm en un lector de ELISA Multiskan.

l) Los valores de absorbancia obtenidos se tabularon y las absorbancias relativas fueron calculadas mediante la división de cada valor

individual por la media de los valores del control positivo. Este control fue el mismo para todas las placas y para los distintos ensayos de valoración de estos anticuerpos. Los valores relativos nos permitieron comparar los resultados de ensayos independientes.

7.4.2 Determinación de anticuerpos anti-Histonas

Para la valoración de la producción de anticuerpos anti-histonas se empleó la técnica de ELISA indirecto no competitivo, basada en la descrita por O' Dell y Kotzin (O'Dell and Kotzin, 1985).

- a) Se preparó una solución de histonas a una concentración de 2,5 µg/ml en PBS 1X. El ajuste de concentración de proteína se realizó por lectura en el espectrofotómetro a 230 nm de una dilución 1/20 en 1M NaOH de la solución de histonas. La concentración se calculó de la siguiente manera:

$$[\text{Histonas}]_{\text{mg/ml}} = \text{DO}/3,3 \quad (\text{DO}=\text{Abs obtenida} \times \text{dilución empleada})$$

$$\text{Factor Dilución} = [\text{Histonas}] \times 1000 / 2,5 \mu\text{g/ml}.$$

El Factor Dilución indica el número de veces que hay que diluir 1 ml de la solución de histonas con PBS 1X frío.

- a) Se sensibilizaron placas de microtitulación Nunck con 200 µl/pocillo de la solución de histonas preparada, durante toda la noche a 4° C.

- b) Después de retirar la solución de histonas, se guardaron las placas a $-20^{\circ} C$ hasta ser utilizadas, o bien, se procedió como indica el siguiente apartado.
- c) Bloqueo de placas con 200 μ l/pocillo de la solución de 1mg/ml *Gelatina* en PBS 1X, durante toda la noche a $4^{\circ} C$.
- d) Después de retirar la solución de bloqueo, las placas se lavaron X3 con 0,05% TWEEN/PBS 1X.
- e) Se incubaron durante 1 h a t.a. con 100 μ l/pocillo de una dilución 1/100-1/800 de controles positivos y una dilución 1/100-1/200 de sueros problema, en tampón de dilución.

<u>Tampón de dilución:</u>	1 mg/ml <i>Gelatina</i>
	0.05% TWEEN / PBS 1X
	5 mg/ml - <i>Globulina Bovina</i>

- f) Se lavaron X6 con tampón 0.05% TWEEN/PBS 1X por espacio de 30 min.
- g) Se incubaron con 100 μ g/pocillo de una dilución 1/2000 de anti-IgG ratón marcado con peroxidasa (Caltag), en tampón de dilución diluido con tampón de lavado (v:v), durante 1 h a t.a..
- h) Se lavaron X5 con tampón de lavado por espacio de 30 min, realizando el último lavado con PBS 1X.

- i) Se incubaron con 200 μ l/pocillo del substrato de la peroxidasa, ortofenil-diamina (Sigma), durante 30 min en la oscuridad.
- j) Después de parar la reacción con 50 μ l/pocillo de una solución de ácido sulfúrico al 25% (Merck), se realizó una lectura a 492 nm en un lector de ELISA Multiskan.

7.4.3 Determinación de anticuerpos anti-FR

- a) Se incubaron placas de microtitulación Nunck con 200 μ l/pocillo de IgG humana (Fracción II de Conh, Difco) o IgG de ratón (Miles) a la concentración de 10 μ g/ml en tampón 50 mM carbonato-bicarbonato sódico pH 9.6, durante una noche a 4° C.
- b) Después de lavar X3 con el tampón de lavado 0.05% TWEEN-20 en PBS 1X, las placas se incubaron durante 1 h con la solución de bloqueo 10% FCS en PBS 1X.
- c) Se lavaron de nuevo las placas por espacio de 10 min, y se incubaron con 200 μ l de los sueros a estudiar diluidos 1/100 en 1% FCS en PBS 1X, durante 2 h a t.a..
- d) Después de lavar X5 con el tampón de lavado, las placas se incubaron durante 1 h a t.a con 200 μ l de una solución 1/500 de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (Sigma) marcados con peroxidasa, previamente purificados por afinidad y absorbidos con IgG humana unida a sepharosa 4B para evitar reactividad cruzada.

- e) Después de esta segunda incubación, las placas se lavaron de nuevo, y a continuación se incubaron con 200 μ l/pocillo del sustrato de la peroxidasa, ortofenil-diamina (Sigma), durante 30 min a t.a. y en la oscuridad.

- f) Finalmente, se paró la reacción colorimétrica añadiendo a las placas 50 μ l de una solución de ácido sulfúrico al 25%, y se realizó una lectura en el lector de ELISAS a 492 nm.

Los valores de factor reumatoide se expresaron por unidades de absorbancia relativa. Para ello en todas las placas se valoró el mismo control positivo. El cociente entre la absorbancia de los distintos sueros y el control positivo expresó los valores de absorbancia relativos que permitieron comparar resultados de experimentos independientes.

7.4.4 Determinación de anticuerpos anti-Glucosa-6-fosfato Isomerasa

- a) Se sensibilizaron placas de microtitulación Nunck con Glucosa-6-fosfato isomerasa diluida en tampón 50 mM carbonato-bicarbonato sódico pH 9.6 a una concentración de 5ng/100 μ l/pocillo, durante una noche a 4° C en cámara húmeda.

- b) Después se procedió del mismo modo que en el apartado 7.4.3 b).

- c) A continuación, se lavaron con tampón 0,05% Tween/PBS X1 (tampón de lavado) por espacio de 10 min, e incubaron con 100 μ l de los sueros

a estudiar diluidos 1/200 en 0.05% Tween /PBS 1X, durante 2 h a t.a. en cámara húmeda.

- d) Las placas se lavaron de nuevo X5 con el tampón de lavado, y se incubaron durante 2 h a t.a. con 100 μ l de una dilución 1/2000 de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (Sigma) marcados con peroxidasa.
- e) Las placas se lavaron de nuevo X5 con el tampón de lavado y se incubaron con 200 μ l/pocillo del sustrato de la peroxidasa, ortofenil-diamina (Sigma), durante 30 min a t.a. y en la oscuridad.
- f) Finalmente, se paró la reacción colorimétrica añadiendo a las placas 50 μ l de una solución de ácido sulfúrico al 25%, y se realizó una lectura en el lector de ELISAS a 492 nm.

Los valores de Glucosa-6-fosfato isomerasa se expresaron por unidades de absorbancia relativa. Para ello en todas las placas se valoró el mismo control positivo. El cociente entre la absorbancia de los distintos sueros y el control positivo expresó los valores de absorbancia relativos que permitieron comparar resultados de experimentos independientes.

7.4.5 Determinación de Igs en suero

Se determinaron los niveles séricos de IgG, IgG1 y IgG2a, mediante la técnica de inmunodifusión radial y los niveles séricos de IgE mediante la técnica de ELISA sandwich o de captura.

Para la valoración de la clase de IgG y subclases:

- a) Se emplearon placas de geles de agarosa con pocillos premoldeados, de la casa comercial (The binding site, Birmingham Research Park, Birmingham, UK) conteniendo en cada caso la anti-Inmunoglobulina específica para cada subclase de Ig a analizar (IgG1, IgG2a e IgG2b), en los sueros problema.
- b) Se dispensaron 5 μ l de una dilución 1/5 de cada uno de los sueros problemas y de cada una de las 5 diluciones dobles seriadas de los calibradores, en los pocillos del gel. Se incubaron 72h para permitir la difusión de las Igs dentro del gel. En la zona donde la proporción Ag (inmunoglobulina del suero) y Ac (antiglobulina) fue la óptima, se formó un precipitado en forma de anillo alrededor de cada pocillo del gel.
- c) Cada 24h se midió y se registró el diámetro de los halos de inmunoprecipitado formados alrededor de cada pocillo. Dado que la concentración de antiglobulina es constante, el diámetro del anillo es proporcional a la concentración de Ag (inmunoglobulina del suero).
- d) Se representó en un gráfico semi-logarítmico la curva estándar, indicando en el eje de las "Y" (ordenadas) el diámetro de cada anillo correspondiente a cada dilución estándar (en mm) y en el eje de las "X" (abcisas) la concentración de inmunoglobulina conocida correspondiente (en mg/ml, escala logarítmica).

- e) Finalmente, se determinó la concentración de Igs de los sueros problemas extrapolando el valor del diámetro de cada anillo correspondiente a estos en la curva estándar.

Determinación de IgE en suero:

- a) Se sensibilizaron placas de plástico de microtitulación Nunk de 96 pocillos con 100 μ l del Ac monoclonal de captura anti ratón IgE (R35-72; Pharmingen) a una concentración de 2 μ g/ml en 1X PBS durante toda la noche a 4° C.
- b) Después de sensibilizar las placas, se lavaron X3 con el tampón de lavado 0,05% Tween en 1X PBS, y se bloquearon con 200 μ l de 10% FCS en 1X PBS durante 1h.
- c) Se eliminó el exceso del agente bloqueante lavando las placas de nuevo X3 con Tween/PBS, y a continuación, se incubaron con 100 μ l de una dilución 1/500 de los sueros problemas y de cada una de las 8 diluciones dobles seriadas, empezando por 0.5 μ g/ml, del estándar IgE murino purificado (27-74; Pharmingen), en 1% FCS en 1X PBS, durante 1h a temperatura ambiente.
- d) Pasado el tiempo de incubación, las placas se lavaron X3 con 0,05% Tween en 1X PBS, y a continuación se incubaron con 100 μ l del monoclonal secundario anti-ratón IgE conjugado con biotina (R35-92; Pharmingen) a una concentración de 2 μ g/ml en 1% FCS en 1X PBS, durante 1h a t.a.

- e) Se eliminó el exceso del anticuerpo monoclonal libre con sucesivos lavados (X6) con Tween/PBS, y se incubaron las placas con 100 μ l de avidina unida a peroxidasa HRP, Sav-HRP (Pharmingen), durante 30 min a t.a.

- f) Después de eliminar el exceso de Sav-HRP lavando X6 con Tween/PBS, se añadió el substrato de la peroxidasa.

- g) Finalmente, se paró la reacción enzimática con 25% ácido sulfúrico y se midió el producto resultante en un espectrofotómetro a 492 nm.

8. ESTUDIOS CELULARES

8.1 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y ESTUDIO DE LOS NIVELES DE QUIMERISMO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

En el tiempo de la autopsia se procedió al análisis fenotípico de las diferentes poblaciones linfocitarias de bazo y de timo. Se estudiaron animales pertenecientes a los grupos que recibieron el estímulo semialogénico, no tratados y tratados con IL-12, así como también de los animales pertenecientes a los grupos control. Se procedió como indica el siguiente protocolo:

- a) A partir de una muestra de timo y de bazo, se prepararon suspensiones de células tímicas y de esplenocitos, como se describe en el apartado 2.1 para ganglios y bazo. En el último lavado, el botón

celular se resuspendió en una solución de PBS (a 4° C) y se distribuyeron 1 X 10⁶ células por tubo.

<u>Solución de PBS:</u>	97 ml PBS
	3 ml Suero de ternera fetal
	1 ml solución 10% azida sódica

- b) A continuación, las células se incubaron con 50 µl de la dilución óptima del anticuerpo correspondiente durante 30 min, a 4° C, protegidos de la luz.
- c) Se lavaron X2 las células en la solución de PBS. Si el anticuerpo empleado no estaba conjugado con fluorocromo o estaba marcado con biotina, se volvió a incubar con 50 µl del segundo reactivo marcado con fluorocromo o estreptavidina marcada con fluorocromo, respectivamente, en las condiciones anteriores. Posteriormente el botón celular se lavó X2 y se fijó la muestra añadiendo 500 µl de la solución de fijación (2% formaldehído en PBS).

Para estudiar el grado de quimerismo debido a la repoblación por células de origen donante en aquellos animales que recibieron el injerto, antes y después de la administración de IL-12, se marcaron las células simultáneamente con dos anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos H-2K^k, expresados en células de ratones CAF1 pero no en células de ratones BALB/c, y H-2K^d, expresados en células CAF1 y también en células BALB/c. De manera que, aquellas células del huésped que fueron reconocidas por los dos anticuerpos monoclonales provenían del receptor y las células reconocidas sólo por el anticuerpo monoclonal H-2K^d eran de origen donante.

En la tabla 5 se detallan los anticuerpos monoclonales utilizados durante la realización de esta tesis, el fluorocromo que llevan conjugado, las diluciones óptimas empleadas y las subpoblaciones linfocitarias que reconocen.

Tabla 5

Ac monoclonal	Conjugado	Origen	Dilución óptima	Subpoblación reconocida
-Thy 1.2	PE	Caltag	1/50	Células T
-CD4 ⁺	PE	Caltag	1/50	Células CD4 ⁺
-CD4 ⁺	FITC	Labgen	1/50	Células CD4 ⁺
-CD8 ⁺	FITC	Labgen	1/50	Células CD8 ⁺
-B220	FITC	Labgen	1/50	Células B
-Fas	PE	Pharmingen	1/50	Células apoptóticas
-Pan NK	PE	Caltag	1/50	NK
- NK-PK136		Catg SO San Francisco CA	1/50	NK
-H-2k ^k	PE	Pharmingen	1/50	Cél H-2 clase I receptoras
-H-2k ^d	FITC	Pharmingen	1/50	Cél H-2 clase I donantes
-Ia ^k	PE	Pharmingen	1/50	Cél H-2 clase II receptoras
-Ia ^d	FITC.	Pharmingen	1/50	Cél H-2 clase II donantes

8.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

8.2.1 Actividad citotóxica mediada por células T (CTL)

La citotoxicidad mediada por células T (CTL) fue determinada mediante ensayo de liberación de ^{51}Cr . Se estudió la capacidad citotóxica anti-H-2^a (K/d) y anti-H-2^d de los esplenocitos procedentes de animales con EICH (CAF1+BALB/c) (ensayo *in vivo* de la actividad CTL).

Protocolo:

- a) Para la obtención de células citotóxicas efectoras, a partir del bazo de un animal con EICH, se preparó una suspensión de esplenocitos tal y como se describe en el apartado 2.1 (c-d).

- b) Para la obtención de células diana:

Se generaron blastos a partir de esplenocitos BALB/c y CAF1 estimulados con mitógenos (5×10^6 esplenocitos en presencia de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Con A, 48h/37° C);

Después de lavar la suspensión de blastos diana X2 con medio de cultivo celular (MCC), se incubó el botón celular con 200 μl de ^{51}Cr (1 mCi/ml de actividad específica) y 20 μl de suero de ternera fetal (FCS) durante 2h/37° C. El ion cromato difunde a través de la membrana celular y se retiene en el citoplasma.

Una vez marcadas, las células se lavaron X2 con MCC. El

botón celular se resuspendió en 5 ml de MCC y se filtró a través de un cojín de 3ml de FCS mediante centrifugación a 1500 g/4° C durante 10 min.

<u>MCC: RPMI 1640 (Gibco):</u>	10% Suero de ternera fetal (FCS)
	1% Glutamina
	100 U/ml Penicilina
	100 µg/ml estreptomicina
	5x10 ⁻⁵ M 2-mercaptoetanol

- c) Alícuotas de 100 µl de células citotóxicas efectoras (1, 0.5, 0.25, 0.12 y 0.6 X 10⁶ células) se mezclaron con 100 µl de células diana marcadas (10000 células) en placas microtiter con fondo en U. Las placas se centrifugaron 5 seg e incubaron a 37° C y 5% CO₂ durante 4h.
- d) Se depositaron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo en un contador gamma (Beckman). La liberación al sobrenadante del ⁵¹Cr desde una célula diana marcada tiene lugar cuando su membrana celular ha sido dañada suficientemente para permitir el flujo de moléculas intracelulares al exterior.

En cada experimento se incluyeron controles de lisis espontánea: sobrenadantes de cultivos de células diana sin añadir células efectoras (lisis espontánea) y lisis total: la liberación máxima de ^{51}Cr se determinó añadiendo 100 μl de HCl 10N a las células diana. El porcentaje de lisis específica se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ lisis específica} = 100 \times \frac{\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontáneas}}{\text{cpm máximas} - \text{cpm espontáneas}}$$

Los valores se representaron gráficamente indicando en el eje Y el porcentaje de lisis específica y en el eje X los ratios células efectoras:células diana (E:T).

8.2.2 Actividad Natural Killer (NK)

Se determinó la capacidad citotóxica de células NK obtenidas a partir de los esplenocitos procedentes de animales con EICH, sacrificados a los 2 y 10 días de evolución de la enfermedad, tal y como se describe en el apartado anterior 8.2.1 (primer caso), con la diferencia de la utilización de células YAC-1 en crecimiento exponencial (linfoma murino TIB 160, ATCC) como células diana, susceptibles a la lisis por células NK. El resto del estudio siguió un procedimiento idéntico al detallado anteriormente.

8.3 PRODUCCIÓN ESPONTÁNEA DE INTERLEUQUINAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE ESPLENOCITOS

Se procedió como indica el siguiente protocolo:

- a) A partir de una muestra de bazo, se preparó una suspensión de esplenocitos, tal y como se describe en el apartado 2.1.
- b) Se ajustó la suspensión de esplenocitos de cada muestra problema y muestra control a una concentración de 4×10^6 cél./ml en medio de cultivo completo y, se incubaron alícuotas de 1ml de dicha concentración por triplicado, en placas de plástico de 48 pocillos a $37^\circ C / 5\% CO_2 / 48h$ para la valoración de IL-4, IL-2, IL-12 e IFN- γ y a $37^\circ C / 5\% CO_2 / 72 h$ para la valoración de IL-10.
- c) A los pocillos destinados a la valoración de IL-2, se les añadieron 100 μ l de anti-IL-2R, para evitar el consumo de IL-2 durante el tiempo de cultivo de las células.
- d) Pasado el tiempo de incubación correspondiente, se recogió el contenido de las placas en tubos de 1.5 ml y se centrifugaron en una microfuga a $14000 g / 4^\circ C / 5 min.$
- e) Los sobrenadantes resultantes se guardaron a $-80^\circ C$ hasta la valoración de cada una de las interleuquinas mencionadas y los

precipitados celulares se desecharon.

Para la valoración de cada una de las interleuquinas se utilizó el kit de ELISA correspondiente, de la casa comercial Endogen (Endogen Cambridge, MA), siguiendo las instrucciones del producto.

9. ESTUDIOS MOLECULARES

9.1 EXTRACCIÓN DE ARN

A partir de muestras de bazo y timo obtenidas de los animales en estudio y congeladas directamente en nitrógeno líquido, se extrajo ARN total utilizando el método de extracción de ARN ULTRASPEC™ (BIOTECH). El método se basa en la homogenización de las muestras biológicas con una solución desnaturalizante que contiene 14 M guanidina y urea, que en combinación con una extracción con fenol y cloroformo proporciona un precipitado específico de ARN con isopropanol.

El procedimiento detallado se describe a continuación:

- a) Se homogeneizaron biopsias de bazo y timo, inmersas en 1 ml del reactivo RNA ULTRASPEC™, con la ayuda de un homogenizador.
- b) Se transfirió el homogenado resultante a tubos de 1,5 ml y se incubaron durante 5 min en hielo, para permitir la disociación completa de complejos nucleoproteicos.

- c) Se añadieron 0,2 ml de cloroformo por cada 1 ml del reactivo RNA ULTRASPEC™, se agitó vigorosamente durante 15 s y se mantuvo en hielo durante 5 min.
- d) El homogenado se centrifugó a 14000 rpm/15 min a 4° C. Después de la adición del cloroformo y la centrifugación, se forman dos fases: la inferior o la fase orgánica y la superior o la fase acuosa. En la fase acuosa se encuentra el ARN.
- e) Se transfirió cuidadosamente la fase acuosa a tubos de 1.5 ml nuevos, sin tocar la interfase. A la fase acuosa transferida a tubos nuevos se añadió el mismo volumen de isopropanol y se guardaron las muestras un mínimo de 10 min a -20° C.
- f) Después, los tubos se centrifugaron a 14000 rpm/10 min. El ARN precipitado forma un precipitado blanco en el fondo del tubo.
- g) Se retiró el sobrenadante y se lavaron X2 con 75% de etanol (1 ml de 75% etanol por cada 1 ml de reactivo utilizado), mediante vórtex y subsiguiente centrifugación a 14000 rpm/5 min.
- h) A continuación, los precipitados se dejaron secar a t.a (Es importante no dejar secar completamente el precipitado de ARN, ya que disminuye su solubilidad) y se disolvieron en 50-100 µl de agua tratada con DEPC, mediante vórtex durante 1 min.

- i) Finalmente se realizaron lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro, a A_{260} y A_{280} . Una muestra de ARN libre de ADN y proteínas tiene una relación A_{260}/A_{280} de aproximadamente 1,8-2,0.
- j) La concentración de ARN se calcula con el valor obtenido de densidad óptica (OD) a 260 nm de las muestras y considerando que 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN equivale a una $OD_{260}=1$.

A partir del ARN total extraído, de muestras de bazo y timo de cada uno de los animales en estudio, se analizó la expresión de los ARN mensajeros que codifican para las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-9, IL-2, IL-6 e IFN- γ , mediante el ensayo de protección contra RNasas (RPA).

9.2 ENSAYO DE PROTECCIÓN CONTRA RNASAS (RPA)

El ensayo de protección contra RNasas (RPA) es un método muy sensible y específico que puede emplearse para la detección, cuantificación y caracterización de múltiples especies de ARN mensajero simultáneamente a partir de una simple muestra de ARN. Se basa en la síntesis de un grupo de sondas de ARN de actividad específica elevada, a partir de un grupo de fragmentos de ADN por la acción de polimerasas de ARN ADN-dependientes. El grupo de sondas de ARN marcado es hibridado en exceso con una solución de ARN diana. La sonda que queda libre, así como otras cadenas de ARN simples, son digeridas con RNasas. Los híbridos que permanecen son purificados, cargados en geles de poliacrilamida

desnaturalizante, y revelados por autoradiografía. La identidad y cantidad de cada especie de ARNm en el grupo de sonda original (no hibridado) se determina basándose en la intensidad de señal dada por el tamaño de banda apropiado al fragmento de sonda protegido.

La realización de la técnica requiere un grupo multi-sondas de ADN, un kit de transcripción *in vitro*, y un kit RPA.

En nuestros experimentos, hemos utilizado el grupo multi-sonda mCK-1 (Pharmlngen) para la detección, cuantificación y caracterización de los ARN mensajeros que codifican para las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-9, IL-2, IL-6 e IFN- γ , y el kit de transcripción *in vitro* para marcar las sondas (Pharmlngen).

Se procedió de la siguiente manera:

9.2.1 Síntesis de la sonda

- a) Se marcó radioactivamente el grupo multi-sondas mCK-1 mediante incorporación de [^{32}P]UTP durante la transcripción por la T7 polimerasa (Kit de Pharmlngen). Para ello, se mezcló en un tubo de 1.5 ml, y en el siguiente orden:

	1 μl ARNsin
	1 μl GACU
	2 μl DTT
	4 μl Tampón de transcripción 5X
	1 μl grupo mCK-1
	10 μl [^{32}P]UTP
	1 μl T7 polimerasa
	e incubó 1h a 37° C.

b) Se paró la reacción añadiendo 2 μ l de DNasa a la mezcla anterior e incubando 30 min a 37° C.

c) A continuación, se añadieron los siguientes reactivos:

	26 μ l 20 mM EDTA
	25 μ l Tris-fenol saturado
	25 μ l cloroformo: alcohol isoamílico (50:1)
	2 μ l ARNt levadura

que se mezclaron mediante vórtex hasta obtener una emulsión y se centrifugaron en una microfuga 5 min a t.a.

d) La fase superior acuosa resultante, se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo, se añadió 50 μ l de acetato amónico 4M y 250 μ l de etanol absoluto frío y se incubó 30 min a -70° C. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó en una microfuga 15 min a 4° C.

e) Cuidadosamente se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 100 μ l de etanol al 90% frío.

f) Después de centrifugar en microfuga 5 min a 4° C, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a t.a durante 5-10 min. A continuación, se solubilizó el precipitado con 50 μ l de tampón de hibridación vorteando suavemente durante 20 s.

- g) Finalmente, se cuantificó cpm/ μ l a partir de 1 μ l, en un contador beta (Tri-Carb 2100 TR Liquid Scintillation Analyser, Packard) sin líquido de centelleo. La sonda se guardó a -20° C hasta ser utilizada. Generalmente la sonda sólo puede utilizarse en dos hibridaciones sucesivas de toda la noche.

9.2.2 Hibridación de la sonda con muestras de ARN

- h) Se añadieron 10 μ g de ARN de las muestras a estudiar en tubos de 1.5 ml. El ARN disuelto en agua, se secó completamente en una centrífuga con evaporación al vacío durante 1h.
- i) Se añadieron 8 μ l de tampón de hibridación a cada tubo y se solubilizó el ARN vorteando suavemente durante 3-4 min.
- j) La sonda referida en el apartado g) se diluyó a la concentración apropiada. La concentración óptima (cpm/ μ l) de cada grupo de sondas está indicado en el folleto técnico que incluye cada grupo. Se añadieron 2 μ l de la sonda diluida a cada muestra de ARN y se mezcló mediante pipeteo. A continuación se añadió una gota de aceite mineral y se hizo un pulso de centrifugación.
- k) Se colocaron las muestras en un bloque térmico a 90° C. Inmediatamente se bajó la temperatura a 56° C (permitiendo que la temperatura bajase paulatinamente) y se incubó durante 12-16h. A continuación se bajó la temperatura a 37° C y se incubó durante 15

min antes del tratamiento con RNasa, permitiendo de nuevo que la temperatura bajase paulatinamente.

9.2.3 Tratamiento con RNasa

l) Se preparó la solución de RNasa (para 20 muestras):

	2,5 ml Tampón de RNasa
	6 µl RNasa A + T1

Se dispensaron 100 µl de la solución de RNasa a cada muestra y se centrifugaron durante 10 s y se incubaron durante 45 min a 30° C.

m) Antes de que la digestión con RNasa finalizara, se preparó la solución de Proteinasa K (para 20 muestras):

	390 µl Tampón de Proteinasa K
	30 µl Proteinasa K
	30 µl ARN de transferencia de levadura

y se añadieron 18 µl de la mezcla a tubos de 1,5 ml nuevos.

n) Una vez digeridas las muestras con RNasas se transfirieron a los tubos que contenía la solución de Proteinasa K y se incubaron 15 min a 37° C.

o) Se añadieron 65 µl de Tris-fenol saturado y 65 µl de cloroformo:alcohol:isoamílico (50:1:1), se mezcló hasta formar una emulsión y se centrifugó 5 min a t.a.

- p) Cuidadosamente, se transfirió la fase superior acuosa a tubos nuevos, se añadió acetato amónico 4M y 650 μ l de etanol absoluto y se incubó 30 min a -70° C.
- q) Después de centrifugar 15 min a 4° C se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de etanol al 90% frío.
- r) Después de centrifugar de nuevo 5 min a 4° C se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar completamente el precipitado. A continuación se añadieron 5 μ l de tampón de muestra en TBE, se vortió 2-3 min y se hizo una centrifugación breve para recoger la totalidad de la muestra. Antes de cargar las muestras en un gel, se calentaron 3 min a 90° C y se dejaron enfriar inmediatamente en hielo.

Tampón de muestra en TBE:

Tampón TBE (pH 8,3):	90mM Tris
	90mM Ácido bórico
	10mM EDTA
	10 mM Urea
	0.025% Azul de bromofenol
	0.025% xylene cianol

9.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

- s) Se lavó un juego de cristales para geles (>40 cm de largo) con abundante agua seguido de etanol. Se silanizó el cristal más pequeño, se lavó de nuevo y se ensambló el molde para el gel (0.4 mm espaciadores), como se describió anteriormente.
- t) A continuación se preparó acrilamida a una concentración final del 5% mezclando los siguientes reactivos:

74.5 ml solución de acrilamida (19:1 acrilamida:bis final)

8.85 ml de acrilamida 40%
9.31 ml de bis acrilamida 2%
7.45 ml de 10X TBE
35.82 g de Urea
cps 74.5 ml agua

450 μ l persulfato amonio 10%

60 μ l TEMED

Se vertió inmediatamente la mezcla en el molde para el gel y se añadió el peine apropiado (ej. Pocillos de 5 mm de anchos).

- u) Después de que la poliacrilamida polimerizara (aprox. 1h), se retiró el peine y se lavaron los pocillos con abundante tampón 0,5X TBE. El gel se dispuso en una cubeta vertical. En primer lugar se hizo una precarrera a 40 W durante 45min, con tampón de carrera 0.5X TBE. La temperatura del gel debe estar a 50° C. Después de lavar de nuevo los pocillos se cargaron las muestras a analizar. Como marcadores, se cargó en uno de los pocillos una dilución del grupo de sondas en

tampón de muestra (1000-2000 cpm/lane). La carrera se realizó a 50W, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó 30 cm del final del gel.

- v) Finalizada la electroforesis, el gel se colocó sobre un papel Whatman, se cubrió con papel de celofan, y se secó durante 1 h a 80° C en un secador de geles (Bio-Rad). A continuación, se colocó el gel seco sobre una película XRP-5 para autoradiografía (Kodak), en un cassette de radiografías y se dejó impresionar durante 24-48h a -70° C, como se describió anteriormente. La cuantificación aproximada se realizó mediante densitometría de la radiografía en un equipo de tratamiento de imagen (Fluor-STM MultiImager de Bio Rad).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para estimar que las diferencias observadas entre los grupos de animales fueron debidas al establecimiento de cada modelo y no a fluctuaciones al azar, así como para comparar estadísticamente los resultados obtenidos entre los distintos grupos de animales, se utilizaron los siguientes tests estadísticos:

1. test t-Student
2. test χ^2 con la corrección de Yates
3. test U de Mann-Whitney

RESULTADOS

1. ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DE LA EICH.

Los aspectos clínicos e inmunológicos de la EICH que hemos observado en ambos modelos experimentales de EICH, CAF1+BALB/c y CAF1+BALB/c+IL-12, así como también en los diferentes grupos control que se detallan en Materiales y Métodos, se describen a continuación:

Sintomatología de EICH aguda: Ninguno de los animales en estudio presentó signos que indicasen la instauración de cuadros agudos de la enfermedad, a pesar de las diferencias en antígenos del MHC de clase I y clase II presentes entre receptor y donante. Tampoco después de la inyección con IL-12. No presentaron rizamiento del pelo ni diarrea ni ningún signo de inmunodeficiencia ni muerte durante los diez primeros días después de la instauración de la EICH. La morfología del timo en los animales estudiados no mostró los cambios histológicos de pérdida de la arquitectura descritos en la forma aguda de la enfermedad.

Lesiones en la piel: A lo largo del seguimiento de la EICH, un total del 5% (1/20) de los animales receptores de células semialogénicas presentaron alopecia extendida por la región del cuello y la parte abdominal, y un total del 10% (2/20) formación de lesiones compatibles con vasculitis localizadas en ambas orejas y alrededor del hocico, a partir de los 3 meses de evolución de la enfermedad.

En el 16.6% (1/6) de los animales con EICH que recibió la IL-4, (grupo control de respuesta Th2-dependiente), se observó la formación de lesiones compatibles con vasculitis en ambas orejas, a partir de los 3 meses de evolución de la enfermedad.

Ninguno de los animales con EICH tratados con IL-12, así como ninguno de los animales pertenecientes a los grupos control negativo, manifestaron ningún tipo de lesión en la piel al menos durante los seis meses de seguimiento de la enfermedad.

Afectación en las extremidades: el 5% (1/20) y el 16.6% (1/6) de los animales con EICH no tratados y tratados con IL-4, respectivamente, manifestaron clínica de inflamación simétrica de las extremidades anteriores a las 20-24 y a las 12 semanas de evolución de la enfermedad, respectivamente. Ninguno de los animales con EICH tratados con IL-12, así como ninguno de los animales pertenecientes a los grupos control singénicos o CAF1 manifestaron clínicamente inflamación simétrica de las extremidades.

Lesiones articulares subclínicas se observaron en el 70% (14/20) del grupo CAF1+BALB/c (13/20 lesiones en la piel y 9/20 lesiones en la articulación), en el 100% (6/6) del grupo CAF1+BALB/c+IL-4 (4/6 lesiones en la piel y 5/6 lesiones en la articulación) y en el 41% de los animales

analizados (7/17) del grupo CAF1+BALB/c+IL-12 (6/18 lesiones en la piel y 5/18 lesiones en la articulación), a los 5-6 meses de evolución de la EICH. Las lesiones en la piel consistieron en la presencia de infiltrados celulares de linfocitos y polimorfonucleares a nivel de la dermis e hiperplasia, hiperqueratosis, espongirosis y exocitosis en la epidermis; las lesiones en la articulación consistieron en áreas focales de leve a moderado engrosamiento de la sinovia. En el animal 1 perteneciente al grupo EICH no tratado y en el 18 perteneciente al grupo EICH tratado con IL-12, indicados en la Tabla 6 que se muestra en la página 105, observamos la presencia de un área focal de moderado y leve engrosamiento del periostio, respectivamente.

El 14% (3/21) de los animales CAF1 control presentó un moderado infiltrado no simétrico en la articulación. Ninguno de los 16 controles singénicos (tratados y sin tratar con IL-12) mostró lesiones aparentes en la articulación. Un animal de los 8 que además del estímulo singénico recibió IL-12, presentó en una extremidad intensa inflamación predominantemente mononuclear y engrosamiento de la sinovia y en la otra extremidad no mostró lesión aparente.

En la figura 6 se muestran imágenes representativas de los grupos estudiados.

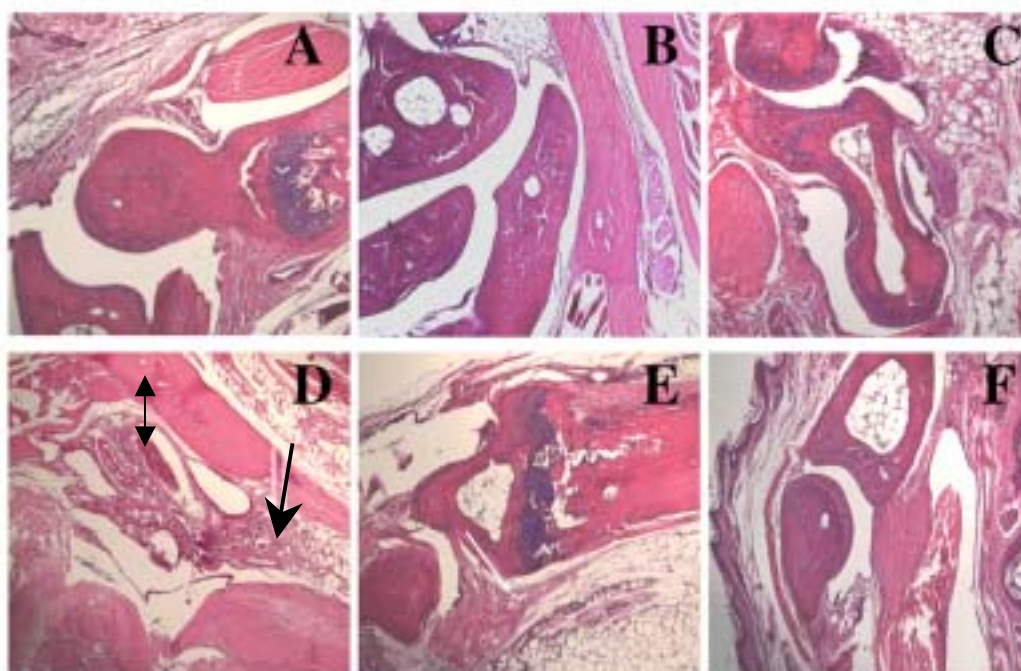


Figura 6

Figura 6: Efecto de la administración de IL-12 sobre la enfermedad articular en ratones con EICH crónica. Tinción histológica con hematoxilina-Eosina de pequeñas articulaciones de las extremidades de (A) un ratón CAF1 control, (B) un ratón perteneciente al grupo CAF1+CAF1+IL12, (C) un ratón perteneciente al grupo CAF1+BALB/c+IL4, (D y E) ratones pertenecientes al grupo CAF1+BALB/c y (F) un ratón perteneciente al grupo CAF1+BALB/c+IL12. En todas estas articulaciones se observa artritis con inflamación de la sinovia (señalada con una flecha) y la presencia de infiltrados linfocitarios (señalados con flecha doble).

Presencia de proteinuria y formación de inmunocomplejos en el riñón:

El 30% (6/20) de los animales con EICH sin tratar, presentó proteinuria entre 100-500 mg/dl, 12 semanas después de la inducción de EICH, y el 14%, de los animales de este grupo que fueron analizados (2/15), reveló la presencia de inmunocomplejos en el glomérulo renal.

Con la administración de IL-4, el 50% de los animales presentaron proteinuria del orden de 500 mg/dl, a partir del mes y medio de evolución de la enfermedad. El examen por inmunofluorescencia directa de la biopsia renal, realizada en el momento de la autopsia de todos estos animales reveló la presencia de inmunocomplejos en el glomérulo renal de todos los que presentaron proteinuria.

Con la administración de IL-12, ninguno de los 42 animales estudiados desarrolló proteinuria en ningún momento del seguimiento de la enfermedad. Tampoco se observó la presencia de depósitos de inmunoglobulinas en el glomérulo renal de 9 animales analizados de este grupo. De la misma manera, ninguno de los animales pertenecientes a los grupos control negativo mostró signos de glomerulonefritis o depósitos de inmunocomplejos en el glomérulo.

Presencia de esplenomegalia: Después de la administración de las células semialogénicas (BALB/c) todos los animales tratados con IL-12, o IL-4, o sin tratar con ninguna interleuquina, mostraron un incremento significativo del peso del bazo a lo largo del seguimiento de la enfermedad, respecto a los animales CAF1 que no recibieron estímulo alguno. El grado de significación de este incremento fue para los animales CAF1+BALB/c una $p < 0,0046$ y para los animales CAF1+BALB/c+IL-12 y CAF1+BALB/c+IL-4 una $p < 0,0001$. El incremento fue del orden de 2 veces el valor normal, en los grupos CAF1+BALB/c no tratados y tratados con la IL-12, y del orden de 4

veces en el grupo CAF1+BALB/c tratado con IL-4. No se encontraron diferencias significativas en el peso del bazo entre los grupos de EICH singénicos y los controles CAF1. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el tiempo, intra-grupo, ni entre los modelos de EICH, CAF1+BALB/C y CAF1+BALB/c+IL-12. Los animales con EICH inyectados con IL-4, como grupo control de respuesta Th2-dependiente, mostró un incremento significativo del peso del bazo respecto al grupo CAF1+BALB/C ($p < 0,006$) y al grupo CAF1+BALB/C+IL-12 ($p < 0,003$).

En la figura 7 se representa gráficamente la Media \pm Error ST del peso del bazo en mg de los grupos en estudio.

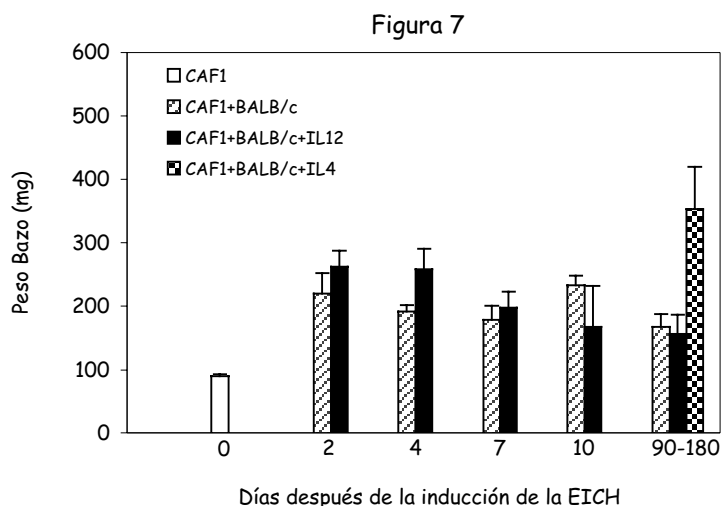


Figure 7. Efecto de la administración de IL-12 sobre el peso del bazo de ratones con la EICH. Los resultados expresan la media del peso \pm el Error St de los bazos procedentes de 4-20 ratones CAF1+BALB/c no tratados y tratados con IL-12 y de 6 CAF1+BALB/c tratados con IL-4, en los tiempos indicados después de la inducción de la EICH. El valor del grupo control CAF1 representa la media del peso \pm el Error St del total de animales de todos los grupos antes de la inducción del estímulo semialogénico (día 0). Los pesos de los bazos de los animales CAF1+BALB/c no tratados y tratados con IL-12 fueron significativamente diferentes $p < 0.005$ respecto al grupo control negativo de la EICH (CAF1) y respecto al grupo control positivo de la EICH (CAF1+BALB/c+IL-4) en los tiempos indicados después de la inducción de la EICH. Las diferencias entre los animales que recibieron el estímulo semialogénico no tratados y tratados con la IL-12 no fueron estadísticamente diferentes durante el seguimiento de la enfermedad.

2. ESTUDIOS SEROLÓGICOS

2.1 VALORACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS

Para determinar el efecto *in vivo* de la administración de IL-12 en el modelo de EICH sobre el cambio de clase de inmunoglobulinas se han valorado los niveles séricos de las inmunoglobulinas Th2-dependientes, IgE y IgG1, y los de la inmunoglobulina Th1-dependiente, IgG2a, en los diferentes grupos de animales. Las muestras séricas fueron recogidas antes de la inducción de la EICH (t=0) y semanalmente durante el curso de evolución de la misma.

Con la inyección de células semialogénicas BALB/c, los animales huéspedes incrementaron significativamente ($p < 0.005$) la producción en suero de las inmunoglobulinas analizadas (IgE, IgG, IgG1 y IgG2a) entre los 7-30 días de evolución de la enfermedad (Figura 8). En los últimos tiempos analizados del seguimiento de la enfermedad se observó que el tratamiento *in vivo* con IL-12 inhibía significativamente el aumento de IgE (a los 60 y 90 días post-inducción de la enfermedad) y IgG1 (a los 30 días post-inducción de la enfermedad) detectado en el grupo de animales con EICH sin tratar (Mann-Whitney $p < 0.0016$, t-test $p < 0.0004$ y Mann-Whitney $p < 0.0030$, t-test $p < 0.044$, respectivamente). Además, aunque no fue estadísticamente significativo, los niveles de IgG2a fueron más elevados en los animales inyectados con IL-12 que en los animales que no recibieron este tratamiento (Mann-Whitney $p < 0.077$).

Como control positivo de respuesta Th2, se observó un incremento

significativo en los niveles de IgE y IgG1 como resultado de la inyección de IL-4 (Mann-Whitney $p < 0.0114$ y $p < 0.001$, respectivamente).

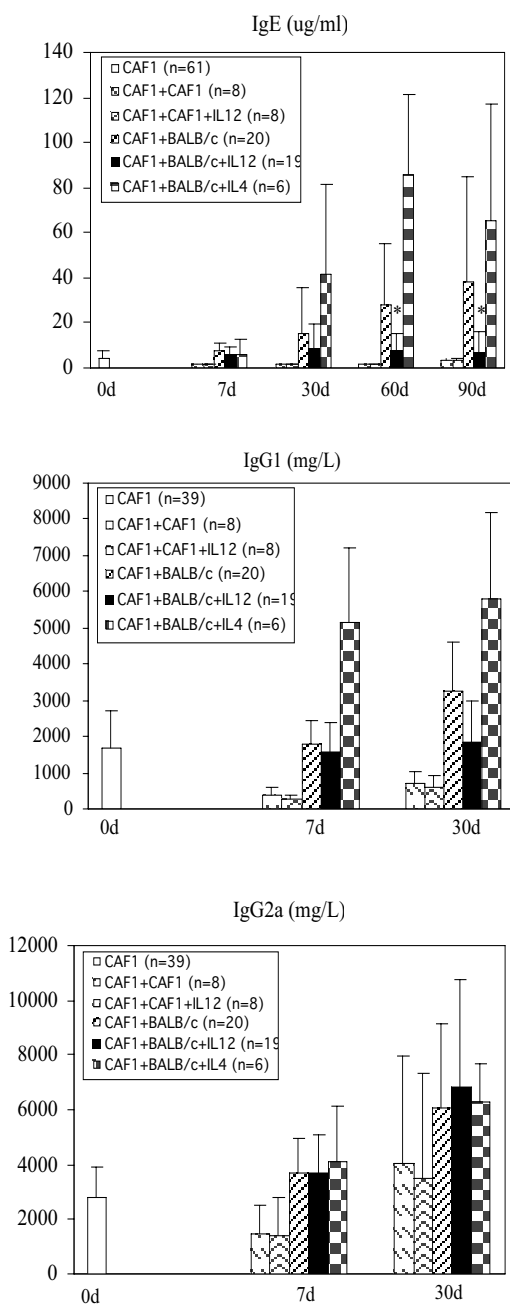


Figure 8. IL-12 inhibe la diferenciación de células T hacia el fenotipo Th2 en ratones con EICH crónico. Se analizaron los niveles en suero de IgG, IgG1, IgG2a, mediante inmunodifusión radial, y IgE, mediante ELISA, de los ratones CAF1, CAF1+BALB/c, CAF1+BALB/c+IL-12 y CAF1+BALB/c+IL-4, los días indicados después de la inducción de la EICH. Los resultados expresan la Media de grupos de entre 6-20 animales \pm Error St. Con relación al grupo control CAF1, los niveles de todas las inmunoglobulinas incrementaron significativamente ($p < 0.005$) después del estímulo semialogénico, en los tiempos indicados de seguimiento de la enfermedad. El tratamiento con IL-12 inhibió significativamente el aumento de IgG1 y IgE observado en el grupo de animales con la EICH no tratado, al final del seguimiento de la enfermedad (*=Mann-Whitney $p < 0.0016$ y *=t-test $p < 0.044$). El efecto contrario se observó en el grupo CAF1+BALB/c tratado con IL-4.

2.2 AUTOANTICUERPOS

2.2.1 ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

La formación de anticuerpos antinucleares (ANAs) detectados por IFI, que caracteriza las enfermedades del tejido conectivo humanas y están presentes frecuentemente en modelos murinos de la forma crónica de EICH, se detectaron en el 7% (1/14) de los animales del grupo CAF1+BALB/c a los 7 días después de la inyección de células semialogénicas. Esta frecuencia fue incrementando con el tiempo de evolución de la enfermedad obteniéndose el pico de máxima incidencia, a los 120 días de seguimiento de la misma, cuando el 92% de los animales habían desarrollado ANAs.

Con la administración de IL-12, a los 7 días de evolución de la enfermedad, el 46% (6/13) de los animales desarrollaron ANAs. Esta frecuencia también fue incrementando con el tiempo de evolución de la misma, alcanzándose el pico de máxima producción, con el 79% (15/19) de los animales, a los 45 días post-inducción de la EICH .

Con la administración de IL-4, no se detectó la producción de ANAs hasta los 30 días de evolución de la enfermedad, en el 16.6% de los animales. Sin embargo, se alcanzó el pico de máximo frecuencia de ANAs (en el 100% de los animales) a partir de los 45 días post-inducción de la enfermedad.

En el estudio por IFI del título y tipo de patrón de anticuerpos antinucleares desarrollados, no mostraron diferencias significativas después del tratamiento con ninguna de las interleuquinas, IL-4 o IL-12. En

todos los grupos de animales que recibieron el estímulo semialogénico, independientemente de que fueran o no tratados con IL-12 o IL-4, se observaron los patrones homogéneo, moteado y nuclear mayoritariamente.

De los animales pertenecientes al grupo control, sólo 1 animal del total de 61 analizados a tiempo 0, antes de la inducción de la enfermedad, desarrolló ANAs a títulos bajos detectado por IFI. El 25% (2/8) de los animales pertenecientes al grupo que recibió el estímulo singénico también desarrolló títulos bajos de ANAs a las 20-24 semanas de evolución de la enfermedad. Y ninguno de los animales pertenecientes al grupo que, además de recibir el estímulo singénico, fue tratado con IL-12, desarrolló ANAs.

ESPECIFICIDADES ANTIGÉNICAS.

Las especificidades antigénicas analizadas reconocidas por estos anticuerpos antinucleares fueron: anticuerpos anti-ADN de doble cadena (-ADNdc), anti-histonas (-histonas) y anti-snRNPs. No se encontraron diferencias significativas para ninguna de estas especificidades antigénicas entre grupos.

La media y el Error ST de los valores positivos de anti-ADN de doble cadena más alta alcanzada, fue en el grupo CAF1+BALB/c de $0,65 \pm 0,058$ y se detectó a los 90 días de evolución de la enfermedad, en el grupo CAF1+BALB/c+IL-12 de $1,06 \pm 0,106$ a los 60 días de evolución de la enfermedad y en el grupo CAF1+BALB/c+IL-4 de $0,918 \pm 0,153$ a los 60 días de evolución de la enfermedad. La media y el Error ST de los valores positivos de anti-histonas más alta alcanzada fue, en el CAF1+BALB/c de $1,46 \pm 0,027$ y en el grupo CAF1+BALB/c+IL-12 de $0,85 \pm 0,031$, en ambos

grupos a los 90 días de evolución de la enfermedad y en el grupo CAF1+BALB/c+IL-4 de $0,73 \pm 0,070$, a los 60 días de evolución de la enfermedad.

Todos los animales que desarrollaron glomerulonefritis presentaron anticuerpos anti-DNA_{dc} en suero, pero no todos los que presentaron Ac anti-ADN en suero hicieron proteinuria ni mostraron glomerulonefritis en el tiempo de la autopsia.

El estudio de los anticuerpos anti-SnRNPs, después de 3 meses de evolución de la enfermedad, reveló que de 11 animales del grupo CAF1+BALB/c analizados, el 54% (6/11) mostró anticuerpos que precipitaban hnARN y en el 9% (1/11) se detectó U1snRNP. No se detectó ningún snARN precipitado en el 36% (4/11). En el grupo de animales a los que se les administró IL-12, el 66.6% (4/6) mostró anticuerpos que precipitaban hnARN y el 33% (2/6) fue negativo en el estudio de ARNs inmunoprecipitados.

2.2.2 OTROS AUTOANTICUERPOS

Además de los autoanticuerpos mencionados anteriormente, también determinamos la presencia en suero de anticuerpos frecuentes en el suero de pacientes con artritis reumatoide: anticuerpos anti-IgG FR de la clase IgM, anticuerpos anti-filagrina y anticuerpos anti-glucosa 6 fosfato isomerasa (estos últimos descritos en un modelo animal) (Matsumoto y col., 1999).

En el estudio de los anticuerpos anti-IgG FR de la clase IgM,

consideramos positivos aquellos valores que superaron la $Media+3DesvST$ de 45 animales normales analizados igual a 0.728 (marcados en negrita en la Tabla 6). La determinación realizada a los 20-24 semanas de evolución de la enfermedad mostró diferencias significativas entre grupos en cuanto al porcentaje de animales con estos Ac en suero, obteniéndose frecuencias del 65% (13/20) en el grupo CAF1+BALB/c, del 10,5% (2/19) en el grupo CAF1+BALB/c+IL-12 y del 100% en el grupo receptor de IL-4. La media de los valores positivos fue similar en los 3 grupos: $1,36\pm 0,7$ versus $1\pm 0,16$, versus $1,01\pm 0,103$, respectivamente.

Como se muestra también en la Tabla 6, existen diferencias significativas entre la presencia de estos Ac en el grupo CAF1+BALB/c y la baja frecuencia en los animales después de ser tratados con IL-12. También existe correlación significativa entre la producción de FR y el desarrollo de enfermedad articular ($p=0.048$) en el modelo CAF1+BALB/c, pero no en los grupos de animales inyectados con IL-12 y IL-4.

El estudio de los anticuerpos anti-filagrina realizado a los 90 días de evolución de la enfermedad reveló la presencia de este Ac en un animal perteneciente al grupo CAF1+BALB/c y en un animal perteneciente al grupo CAF1+BALB/c+IL-12, de un total de 20 y 19 animales analizados, respectivamente. Las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas.

En el estudio de los anticuerpos anti-glucosa 6 fosfato isomerasa realizado a los 90 días de evolución de la enfermedad consideramos positivos aquellos valores que superaron la $Media+2DesvST$ de 39 animales normales analizados igual a 0.146 (se consideran positivos débiles, (+), los

valores que superaron la $Media+2DesvST$ y positivos fuertes, (+++), los valores que superaron $2Media+2DesvST$. Ver Tabla 6). En la determinación de estos Ac dieron positivos el 55% de animales del grupo CAF1+BALB/c respecto a un 58% de animales del grupo CAF1+BALB/c+IL-12. Las diferencias entre grupos no fueron significativas.

Tabla 6. Desarrollo de factores reumatoide y glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) durante el curso de EICH en animales tratados y sin tratar con IL-12. (a) Grupos de 6-20 ratones CAF1+BALB/c no fueron tratados (EICH) o fueron inyectados i.p. con rmIL-12 (EICH+IL-12) o rmIL-4 (EICH+IL-4) tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se determinaron los niveles en suero de FR de la clase IgM, 20 semanas de la inducción de la enfermedad, y los niveles en suero de GPI, 12 semanas de la inducción de la enfermedad, mediante la técnica de ELISA. Los valores de ambos autoanticuerpos están expresados como la media de densidad óptica (492 nm) de duplicados en la reacción de ELISA. Se consideran positivos aquellos valores que excedan la $media\pm 3DesvSt$ igual a 0.728 y la $media\pm 2DesvSt$ igual a 0.18, de 45 sueros controles, para FR de la clase IgM y GPI, respectivamente. ND, no determinado.

(a)	Nº	IgM RF	GPI	Piel	Sinovia
Grupo	animales	(IgG humana)		extremidades	
EICH+IL-12	1	0,2687	-	++	-
EICH+IL-12	2	0,2944	+	+	-
EICH+IL-12	3	0,3049	+	-	-
EICH+IL-12	4	0,3306	+	-	-
EICH+IL-12	5	0,3423	-	ND	ND
EICH+IL-12	6	0,3446	+++	-	-
EICH	7	0,3528	-	-	-
EICH+IL-12	8	0,368	-	-	-
EICH+IL-12	9	0,3715	+++	-	-
EICH	10	0,4007	+++	+	-
EICH+IL-12	11	0,403	-	-	-
EICH	12	0,4171	+++	+	-
EICH	13	0,4322	-	+	-
EICH+IL-12	14	0,4384	-	+	++
EICH+IL-12	15	0,4595	-	-	-
EICH+IL-12	16	0,5398	+	-	++
EICH+IL-12	17	0,5663	+	+++	++
EICH+IL-12	18	0,5835	+	-	+
EICH	19	0,60	+	-	+
EICH+IL-12	20	0,6271	-	-	+(Hueso)
EICH	21	0,6297	+++	+	-
EICH+IL-12	22	0,6682	+++	-	-
EICH	23	0,6708	+	-	-
EICH+IL-12	24	0,6998	+	-	-
EICH	25	0,7282	-	-	-
EICH+IL4	26	0,7352	ND	-	++
EICH	27	0,74	+++	+++	++
EICH	28	0,7823	-	-	-
EICH+IL4	29	0,7831	ND	+	+
EICH	30	0,8066	-	-	++
EICH	31	0,837	-	++	+
EICH+IL-12	32	0,8409	+++	-	-
EICH	33	0,848	-	-	++
EICH	34	0,8505	-	+	-
EICH+IL4	35	0,9287	ND	+	+++
EICH	36	0,947	+	-	-
EICH	37	1	+	+	+
EICH+IL4	38	1,0743	ND	++	+
EICH+IL4	39	1,1263	ND	-	-
EICH	40	1,15	+++	+	++(Hueso)
EICH+IL-12	41	1,1667	-	-	-
EICH	42	1,2868	-	+++	++
EICH+IL4	43	1,4206	ND	+	+
EICH	44	1,9595	+	-	+
EICH	45	2,9314	+++	-	-

3. PERFIL DE CITOQUINAS

3.1 EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Para determinar cómo la IL-12 podría influir *in vivo* en la expresión génica de citoquinas de tipo Th1 y de tipo Th2 en una fase temprana de la EICH, se sacrificaron grupos de 5 ratones (CAF1+BALB/c, CAF1+BALB/cIL-12 y CAF1) a diferentes tiempos después de la inducción de la enfermedad. A partir del ARN extraído del bazo y timo de estos animales se determinaron los niveles de expresión de los genes de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15 e IFN- γ , mediante la técnica de RPA.

Como muestra la figura 9, la IL-12 estimula la expresión de IFN- γ en bazo, mientras suprime la expresión de IL-4 a los 2-7 días después del estímulo semialogénico. Siguiendo la inyección de células semialogénicas en el grupo de ratones no tratados con IL-12, se detectó expresión de los genes de IL-4, IL-10 y IL-15, así como también de IFN- γ a las 48h después de la inducción de la EICH en el 60% (3/5), 100% (5/5), 100% (5/5) y 20% (1/5) de los animales, respectivamente. A los 4 días de la inducción de la EICH, la expresión de los genes de IFN- γ y IL-6 incrementó hasta un 100% (5/5) y un 40% (2/5) de los animales, respectivamente. La expresión génica de IL-4, IL-10, IL-15 y IFN- γ alcanzó el pico máximo a los 7 días después de la inducción de la EICH. Como muestra la figura 9 en estos animales con EICH sin tratar hay una primera expresión de citoquinas Th2>Th1 a los 2 días post-inducción de la enfermedad que a los 4 días varía en un incremento de Th1. Con la inyección de IL-12 los cambios sufridos en esta

cinética no fueron estadísticamente significativos, sin embargo se observó la expresión de IL-2 que alcanzó el pico máximo a los 2 días después de la inducción de la EICH (y que no observamos en el grupo de animales con EICH sin tratar) y los ARNm de IL-10, -13, -15 y IFN- a los 4 días; y el mensajero de IL-6 alcanzó el pico de máxima expresión a los 7 días post-inducción de la enfermedad después del estímulo semialogénico. No se observó expresión de ARNm de IL-4 en ningún momento. Las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en comparación a animales control CAF1.

Este ensayo demuestra una expresión común inicial de los mensajeros de citoquinas de ambos tipos Th1 y Th2 en respuesta a la inducción de la EICH. La IL-12 induce un incremento de IL-6 y disminución de IL-4.

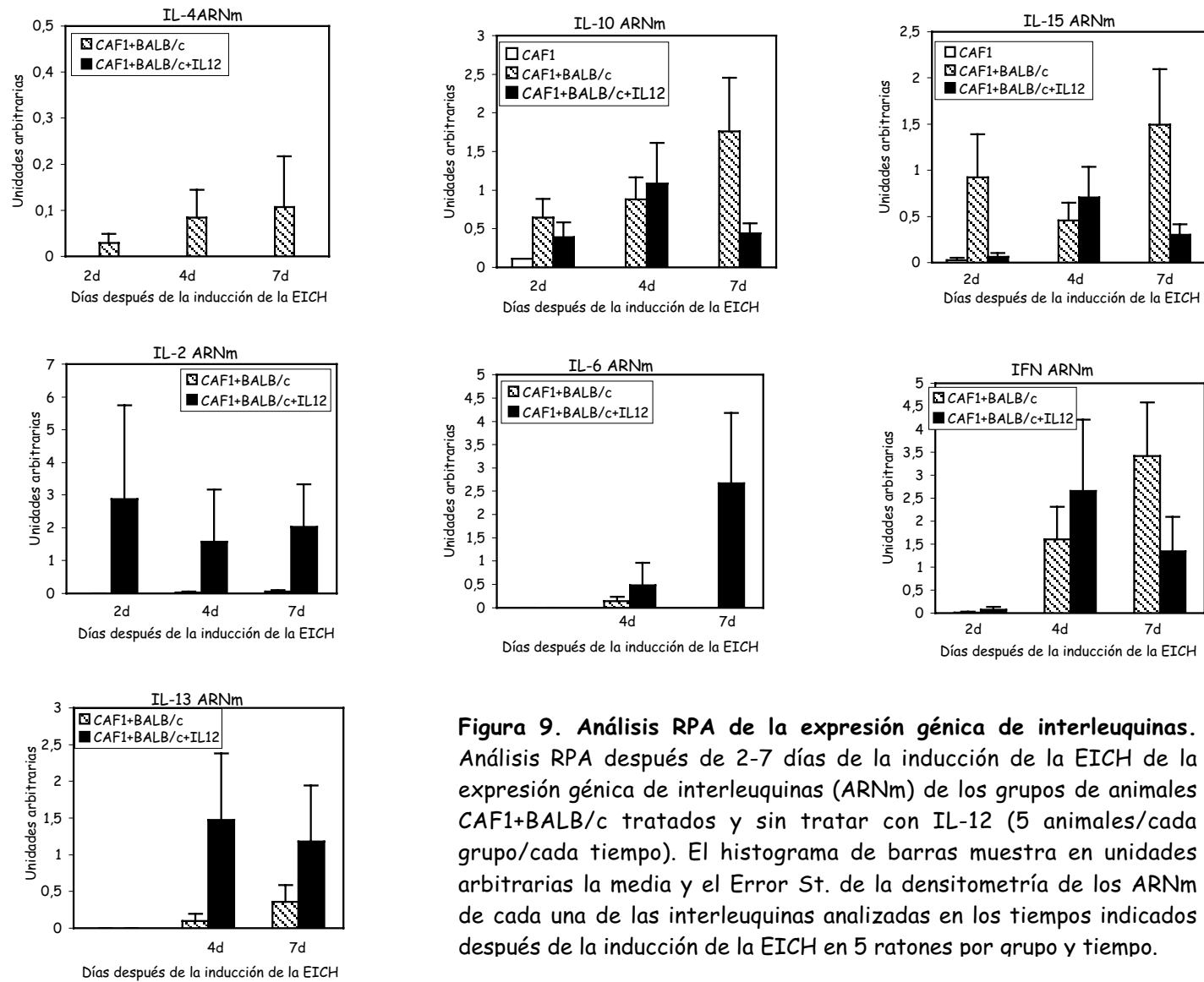


Figura 9. Análisis RPA de la expresión génica de interleuquinas. Análisis RPA después de 2-7 días de la inducción de la EICH de la expresión génica de interleuquinas (ARNm) de los grupos de animales CAF1+BALB/c tratados y sin tratar con IL-12 (5 animales/cada grupo/cada tiempo). El histograma de barras muestra en unidades arbitrarias la media y el Error St. de la densitometría de los ARNm de cada una de las interleuquinas analizadas en los tiempos indicados después de la inducción de la EICH en 5 ratones por grupo y tiempo.

3.2 PRODUCCIÓN ESPONTÁNEA DE CITOQUINAS

Con el fin de determinar de qué manera el tratamiento con IL-12 podía incidir *in vivo* en el balance de citoquinas Th1/Th2 y en las diferencias observadas en los dos modelos de EICH que se describen en esta tesis, se valoró en el momento de la autopsia la producción espontánea de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos del bazo de los animales pertenecientes a los grupos CAF1, BALB/c CAF1 y BALB/c CAF1+IL-12, a los 5-6 meses de evolución de la enfermedad. Los resultados se muestran en la figura 10.

De este ensayo podemos concluir que en el momento de la autopsia realizada a los 5-6 meses de evolución de la enfermedad las células del bazo de los animales con EICH presentan un sesgo hacia una respuesta Th1, que se ve incrementada tras la inyección con IL-12. Tampoco a los 6 meses, y aunque incrementaron los niveles de IL-6 e IFN- γ respecto a los animales con EICH sin tratar, estos no fueron suficientes para incidir en la inflamación articular esperada a pesar de tratarse de un modelo inducido en animales híbridos CAF1 (con un background BALB/c). Otra posibilidad sería que la inflamación articular observada anteriormente en el modelo CAF1+BALB/c estuviese regulada por otras vías distintas a la de IFN- γ o IL-12.

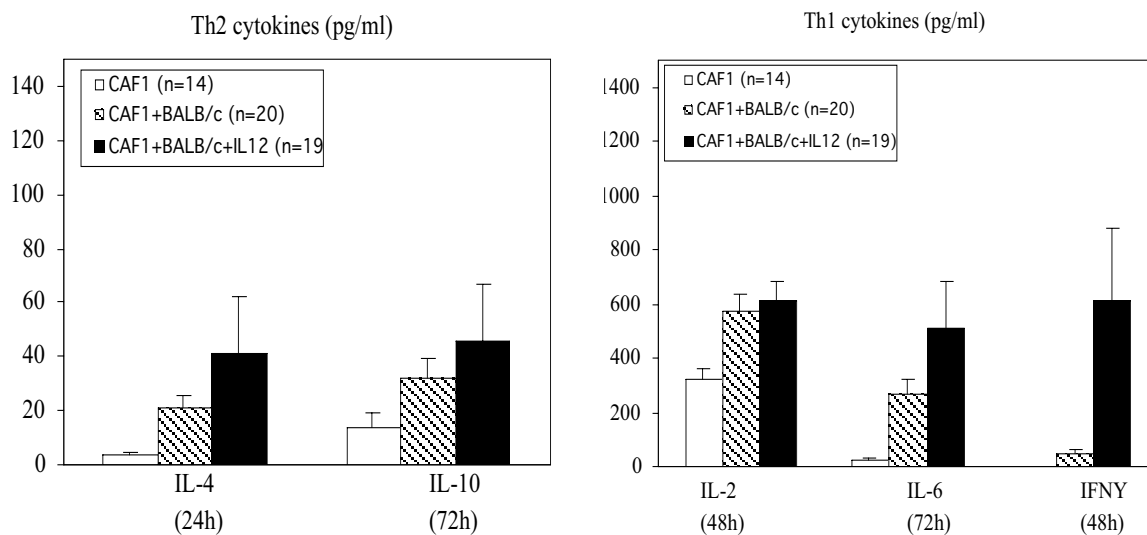


Figura 10. Efecto de la administración exógena de IL-12 sobre la producción espontánea de citoquinas. Se determinó la producción espontánea de las citoquinas Th2-dependientes IL-4 y IL-10 (A), y, de las Th1-dependientes IL-2, IL-6 y IFN- (B), en sobrenadantes de células de bazo en cultivo de 19-20 ratones pertenecientes a ambos grupos de EICH y ratones CAF1, a los 5-6 meses de evolución de la enfermedad. Los resultados expresan la Media \pm Error St. de los valores obtenidos de concentración de proteínas en base a un Stándard.

4. CITOTOXICIDAD

4.1 ACTIVIDAD CTL

Con el fin de valorar la capacidad citotóxica de los animales con EICH no tratados y tratados con IL-12 durante los 10 primeros días de EICH, se analizó la respuesta citotóxica específica frente a blastos H-2K^{k/d} (igual al receptor CAF1). Los resultados que se muestran en la figura 11A indicaron que los animales con EICH no tratados desarrollaban actividad CTL contra el huésped y que ésta aumentaba con el tratamiento de IL-12 (aunque no de manera significativa) (Figura 11A).

En segundo lugar nos propusimos analizar la respuesta en ambos modelos de EICH de actividad CTL del receptor frente al estímulo de las células del injerto (Actividad descrita anteriormente en la bibliografía como células Veto). Se detectó actividad CTL contra el donante en ambos grupos de EICH semialogénica. Los animales tratados con IL-12 presentaban niveles más altos (Figura 11B). Los resultados de la actividad CTL están expresados en porcentajes de lisis específica contra blastos CAF1 (Figura 11A) y contra blastos BALB/c (Figura 11B) a partir de la media \pm Err.ST de tres ensayos medidos a diferentes ratios E:T.

4.2 ACTIVIDAD NK

Se valoró la actividad NK de células del bazo provenientes de dos grupos de animales CAF1 receptores del estímulo semialogénico, no tratados y tratados con IL-12. Animales de ambos grupos fueron sacrificados después de 2 y 10 días de evolución de la enfermedad. Los resultados indicaron que a los 2 días de evolución de la enfermedad, el porcentaje de lisis específica obtenido en el grupo CAF1+BALB/c no varió respecto al obtenido antes de la inducción del injerto, sin embargo, aumentó en dicho grupo después de 10 días de evolución de la enfermedad. Con la administración de IL-12 exógena, (en una única dosis), esta actividad aumentó aunque los niveles de significación fueron bajos debido a la desviación. En la Figura 11C se muestran los resultados de la actividad NK obtenidos a los 10 días de evolución de la enfermedad, expresados en porcentajes de lisis específica contra células YAC-1 a partir de la media \pm Err.ST de tres ensayos medidos a diferentes ratios E:T.

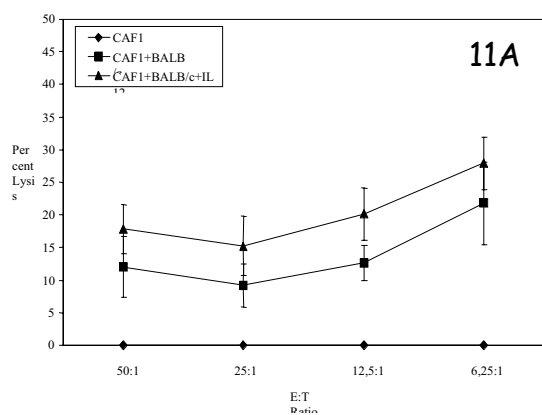
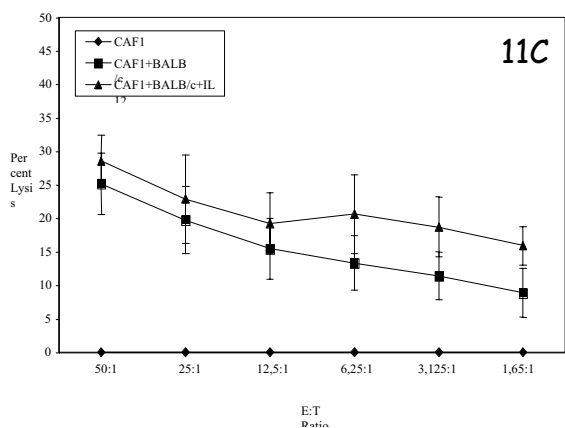
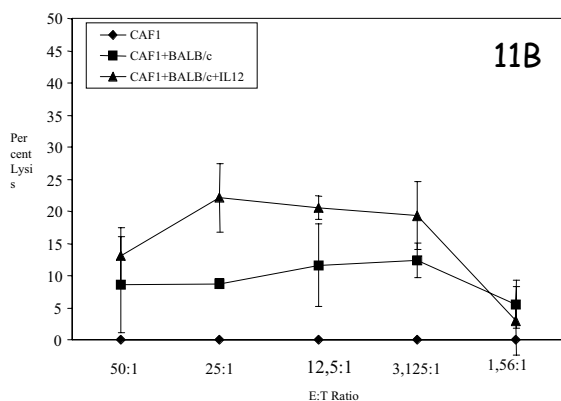


Figura 11. Efecto de la inyección exógena de IL-12 sobre la actividad citotóxica en la EICH. (A) Actividad CTL específica en la EICH crónica. Actividad contra blastos CAF1; (B) actividad CTL contra blastos BALB/c. Los resultados se expresan en porcentaje de lisis específica a partir de la media±Error St de tres ensayos medidos en diferentes ratios E:T; (C) Efecto de la inyección exógena de IL-12 sobre la actividad NK en la EICH. Los resultados se expresan en porcentaje de lisis específica contra células YAC-1, medidos en diferentes ratios E:T.



5. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y ESTUDIO DE LOS NIVELES DE QUIMERISMO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

En primer lugar, analizamos el fenotipo de diferentes poblaciones linfocitarias de bazo y de timo de los animales que recibieron el estímulo semialogénico y el efecto que la IL-12 tenía sobre ellas. También analizamos los animales pertenecientes a los grupos control: CAF1, CAF1 CAF1 y CAF1 CAF1+IL-12, mediante citometría de flujo, según Materiales y Métodos. Se estudiaron las poblaciones de esplenocitos y timocitos de estos animales obtenidas a los pocos días de inducción de la enfermedad: 2, 4 y 7 días después de la inyección del injerto, y cuando ya habían desarrollado el cuadro crónico de la enfermedad después de 5-6 meses de la inyección del injerto.

En segundo lugar analizamos el grado de quimerismo en bazo y en timo debido a la repoblación por células de origen donante en aquellos animales que recibieron injerto, antes y después de la administración de IL-12.

5.1 ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL BAZO

En la tabla 7 se indican los porcentajes de linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y B220⁺ del bazo de los animales de los grupos analizados, (A) al inicio de la enfermedad y (B) en una fase tardía de la misma.

Grupo ^a	Días post-EICH	n	Thy1.2 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	B220 ⁺	NK	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , B220 ⁻
CAF1	0	24	24 ± 1,8 21 ± 2	18 ± 1,08 13 ± 1	10.5 ± 0,7 7,8 ± 0,8	1,7 ± 1,5 1,6 ± 1,2	55 ± 1,72 40 ± 2,8	4 ± 0,16	13.5 ± 4.8 13,6 ± 1,1
	2	7	21 ± 2,9 28 ± 12	13 ± 1,6 13 ± 3	6.7 ± 0,5 7 ± 1,5	1,9 ± 2,9 1,8 ± 2	41.58 ± 5,9 43 ± 11	2,97 ± 0,57	38.6 ± 20 51 ± 23
	4	5	13.5 ± 1,01 23 ± 4	10.8 ± 0,6 18 ± 2	6.6 ± 0,6 12 ± 2	1,6 ± 1 1,5 ± 1	51.5 ± 3,7 86 ± 11	5,22 ± 0,98	31 ± 9.9 54 ± 10,5
GVHD	7	5	25 ± 2,2 9,5 ± 1,8	21.3 ± 2,3 9,5 ± 1,7	17 ± 2,3 6,9 ± 1,7	1,25 ± 1,04 1,4 ± 1	39 ± 5 21 ± 8	3,15 ± 0,64	58 ± 12 11 ± 3
	10	4	22.9 ± 2,5 46 ± 8	11.5 ± 0,9 25 ± 7,7	10.5 ± 1,9 19 ± 0,9	1,09 ± 0,5 1,3 ± 8,5	19.5 ± 6,7 52 ± 30	1,77 ± 0,4	22.4 ± 6.2 128 ± 37
	150	20	20 ± 1,6 20 ± 3	17 ± 1,05 16 ± 2	10 ± 0,7 9,6 ± 1,4	1,7 ± 1,6 1,6 ± 1,4	63 ± 1,4 56 ± 7	-	9.7 ± 5.8 9,7 ± 1,2
GVHD+IL-12	2	9	18 ± 2,1 12 ± 4	12.4 ± 1,6 14 ± 4	6.47 ± 0,5 7 ± 1,5	1,9 ± 3,5 2 ± 2,6	42.8 ± 5,5 53 ± 16	1,9 ± 0,21	43 ± 22 43 ± 11
	4	5	13 ± 4,1 9 ± 3,5	8 ± 1,6 6 ± 1,5	10.4 ± 3,8 8 ± 3	0,76 ± 0,4 0,7 ± 0,5	34 ± 5,2 * 27 ± 4	1,76 ± 0,34	47 ± 20.7 47 ± 21
	7	5	30 ± 1,3 12 ± 2	24 ± 5,5 13 ± 2	22 ± 6,4 10 ± 2	1,09 ± 0,4 1,3 ± 1	46 ± 9,3 23 ± 8,5	1,1 ± 0,21	46 ± 16 10,5 ± 1,8
	10	4	20.8 ± 1,5 25 ± 3,5	13.7 ± 1,8 17 ± 3,5	6.8 ± 1,15 8 ± 1,3	2 ± 1,56 2 ± 2,7	33 ± 12.7 41 ± 11	1,67 ± 0,08	19 ± 3 55 ± 8,8
	150	19	20 ± 1,5 14 ± 3	15.5 ± 5 10,5 ± 2	8 ± 0,5 * 5,5 ± 1	1,9 ± 2,25 1,9 ± 2	61 ± 1,9 40 ± 5	-	14 ± 8.7 * 21 ± 0,5

Tabla 7. Efecto de la IL-12 sobre los porcentajes de las diferentes poblaciones linfocitarias del bazo de ratones con EICH. Se extrajo el bazo de los ratones a los 2, 4, 7 y 150-180 días después de la inducción de la enfermedad, y se analizaron las diferentes poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Los valores indicados en **negrita** expresan la media del grupo (5-20 animales/grupo) ± Error St en porcentajes, y los valores indicados en **azul** expresan la media del grupo (5-20 animales/grupo) ± Error St en valor absoluto. Los valores absolutos son aproximados dado que para la determinación del número total de células se partió de un trozo del bazo (el resto se congeló), aunque se procuró que el trozo correspondiente a cada animal fuera equivalente.

* $p < 0.05$ entre ambos grupos de ratones semialogénicos.; $p < 0.05$ respecto al grupo CAF1.

n= número de animales estudiados en cada uno de los tiempos indicados

En los grupos de ratones CAF1+BALB/c y CAF1+BALB/c+IL-12, los porcentajes de linfocitos T, CD4⁺ y CD8⁺, y B disminuyeron significativamente a los 2 días de evolución de la enfermedad en comparación con los ratones CAF1 ($p < 0.03$), siendo la disminución más notoria después de la administración de IL-12. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ambos modelos de EICH. Con la administración de IL-12, el porcentaje de CD8⁺ se recuperó, en comparación con los ratones CAF1, y el porcentaje de B220⁺ disminuyó respecto a ambos grupos de ratones, CAF1 y CAF1+BALB/c, dos días más tarde (4 días después de la inyección de células semialogénicas). Los niveles de células B en el grupo de EICH sin tratar había duplicado el número de células B respecto al control CAF1. Siete días después de la

inducción de la enfermedad, los niveles de linfocitos T no se recuperaron (aunque sí su porcentaje) y los linfocitos B disminuyeron en relación a los niveles normales, en los 2 grupos de ratones CAF1+BALB/c (no tratados y tratados con IL-12). Debemos enfatizar que entre los días 2 y 10 de evolución de la enfermedad, el 31.6% de esplenocitos en el grupo CAF1+BALB/c y el 40.57% en el grupo CAF1+BALB/c+IL-12 respecto al 16.5% en el grupo control CAF1 no se marcaron con ninguno de los anticuerpos monoclonales utilizados, anti-B220⁺, anti-CD4⁺, anti-CD8⁺ ni anti-Thy1.2⁺. Este porcentaje podía corresponder a células NK, ya que es en este período de la EICH en que observamos actividad funcional NK, sin embargo no podemos demostrarlo ya que no obtuvimos un porcentaje superior al 5% en citometría de flujo con ninguno de los anticuerpos monoclonales anti-NK empleados. Cinco meses después de evolución de la enfermedad, los niveles de células no marcadas volvieron a los niveles normales. Las células B en el grupo de animales con EICH sin tratamiento con IL-12 permaneció incrementado respecto al grupo control CAF1 y animales con EICH tratados con IL-12.

A los 5-6 meses de seguimiento de la enfermedad no se observaron diferencias entre los porcentajes de linfocitos Thy1.2⁺, CD4⁺ y CD8⁺ en los grupos de ratones CAF1+BALB/c y CAF1+BALB/c+IL-12. Es de resaltar el incremento en el porcentaje de linfocitos B en ambos grupos de EICH semialogénica comparado con los ratones CAF1 control (en cifras absolutas este incremento se observa sólo en los animales con EICH no tratados con IL-12) así como la disminución significativa del porcentaje de CD8⁺ en el modelo CAF1+BALB/c+IL-12 comparado con los grupos CAF1 control y CAF1+BALB/c.

5.2 QUIMERISMO PARENTAL EN EL BAZO DE RATONES INDUCIDOS

En la Tabla 8 se muestra el grado de quimerismo detectado durante el seguimiento de la enfermedad en el bazo de los animales de los grupos analizados, expresado en tanto por ciento:

Bazo	Días EICH	n	H-2k ^{d/d}	CD4H-2k ^{d/d}	CD8H-2k ^{d/d}	B220H-k ^{d/d}
GVHD	2	7	2.8 ± 0.7	1.1 ± 10.4	0.19 ± 0.1	1.0 ± 0.4
	10	4	10.3 ± 3.4	3 ± 0.6	3.5 ± 1.1	1.79 ± 0.5
	150	20	43 ± 6.8	7 ± 0.9	5.3 ± 0.4	27 ± 5.2
GVHD + IL-12	2	9	2.1 ± 0.6	1.06 ± 0.3	0.17 ± 0.1	1.2 ± 0.2
	10	4	13 ± 7.0	2.2 ± 0.7	1.56 ± 0.8	3.6 ± 1.5
	150	19	74 ± 7.2 *	12 ± 1.3 *	8 ± 0.7 *	49 ± 5.4 *
GVHD + IL4	90	6	22.8 ± 9.7	3.35 ± 1.7	2.5 ± 0.5	7.60 ± 2.2

Tabla 8. Efectos de la IL-12 sobre los porcentajes de células de origen donante en el bazo de ratones con EICH. Se extrajo el bazo de los ratones en los tiempos indicados después de la inducción de la enfermedad, y se determinó el grado de quimerismo mediante citometría de flujo tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Los resultados expresan la media del grupo (5-20 animales/grupo) ± Error St.

*p<0.05 entre ambos grupos de ratones semialogénicos.

n= número de animales estudiados en cada uno de los tiempos indicados.

A los 2 días después de la inyección de células semialogénicas, las células donantes constituían una media de $2.8 \pm 1.8\%$ del total de células del bazo del huésped, en el modelo de EICH, CAF1+BALB/c. Este porcentaje fue aumentando. El estudio de quimerismo de las células del injerto en el huésped no mostró diferencias importantes en los animales coinyectados con IL-12, en ninguno de los tiempos iniciales de la enfermedad analizados (2 y 10 días post-inducción de la EICH). Sin embargo, el grado de quimerismo se vio incrementado de manera significativa ($p < 0.03$) a los 5-6 meses de evolución de la enfermedad en los animales CAF1+BALB/c coinyectados con IL-12 ($74 \pm 7.19\%$) respecto al grupo CAF1+BALB/c ($43 \pm 31\%$). Este quimerismo estaba constituido principalmente por linfocitos B en ambos grupos de animales. Como se indica en la Tabla 7, después de 150-180 días de evolución de la enfermedad, las células T CD4⁺ y T CD8⁺ del huésped CAF1+BALB/c constituían el 17 y 10 % del total de esplenocitos, respectivamente. Del total de estas poblaciones, el 7 ± 4 fueron T CD4⁺ quiméricas y el 5.3 ± 2 fueron T CD8⁺ quiméricas. Después de la administración de IL-12, las células T CD4⁺ y T CD8⁺ del huésped constituían el 15,5 y el 8 % del total, respectivamente. Del total de estas poblaciones, las células T CD4⁺ y CD8⁺ quiméricas constituían el 12 ± 6 y 8 ± 3 , respectivamente. Su análisis demostró que el 100% de linfocitos CD8⁺ en el grupo CAF1+BALB/c+IL-12 fueron de origen donante y en el grupo CAF1+BALB/c el 50% de linfocitos CD8⁺ fueron de origen donante y el 50% provenían del huésped.

Además, del análisis de los datos de la Tabla 7 se deduce que las células donantes comprenden el 16% de CD4⁺, 12% CD8⁺ y 63% B220⁺ del total de los esplenocitos del huésped en el grupo CAF1+BALB/c y el 16% de CD4⁺,

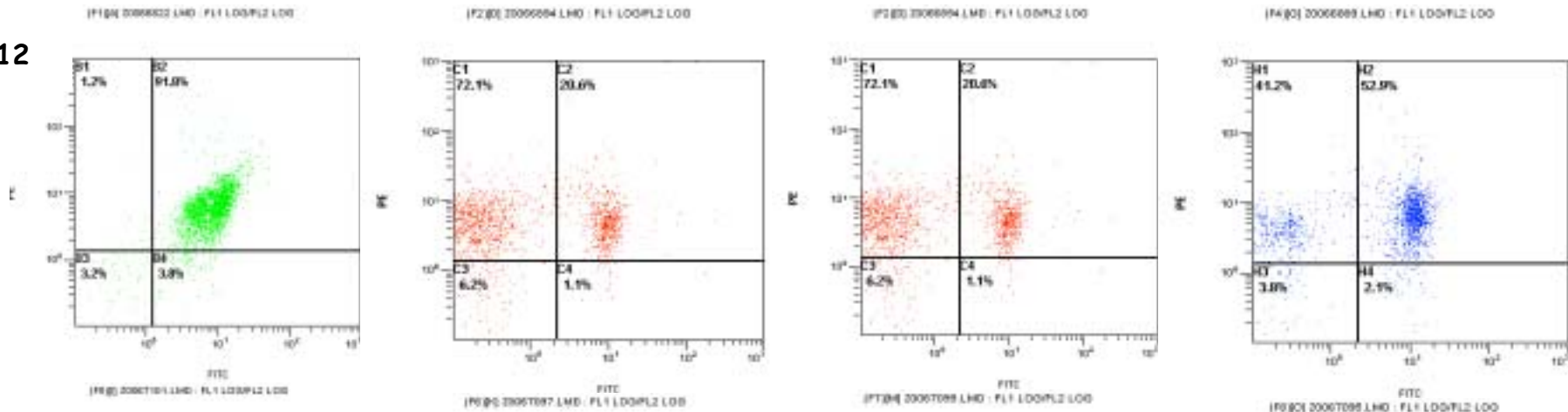
11% CD8⁺, 66% B220⁺ del total de los esplenocitos del huésped en el grupo CAF1+BALB/c+IL-12.

Referente al grupo de EICH que recibió IL-4, el quimerismo fue 2 veces inferior al quimerismo que se detectó en el grupo CAF1+BALB/c y 3 veces inferior al grupo CAF1+BALB/c+IL-12.

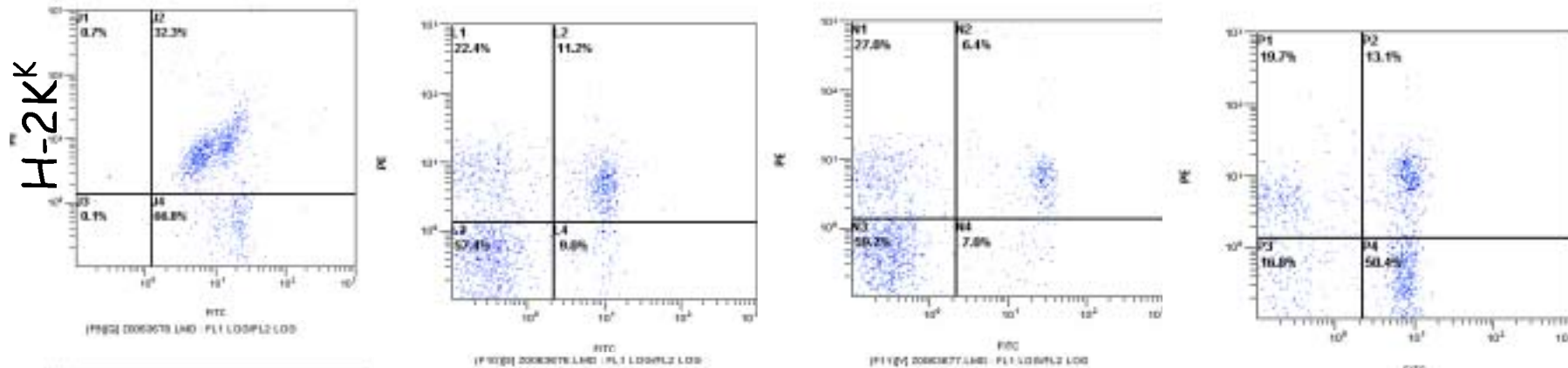
En la figura 12 se muestra un experimento representativo del efecto que la IL-12 ejerce sobre los porcentajes de células de origen donante en el bazo de ratones con EICH. A los 5 meses de inducción de la enfermedad, los esplenocitos de 20 ratones CAF1 (a), 20 con EICH no tratados (CAF1+BALB/c) (b) y 20 tratados con IL-12 (EICH+IL-12) (c) se marcaron con los anticuerpos anti-H-2K^k y anti-H-2K^d para determinar si las células procedían del huésped o eran de origen donante. Las células del huésped CAF1 se distinguían de las células de origen donante BALB/c mediante anticuerpos anti-H-2k^k y anti-H-2K^d. Se utilizaron simultáneamente los anticuerpos específicos de CD4⁺, CD8⁺ y B220⁺ para identificar la subpoblación de células T.

Figura 12

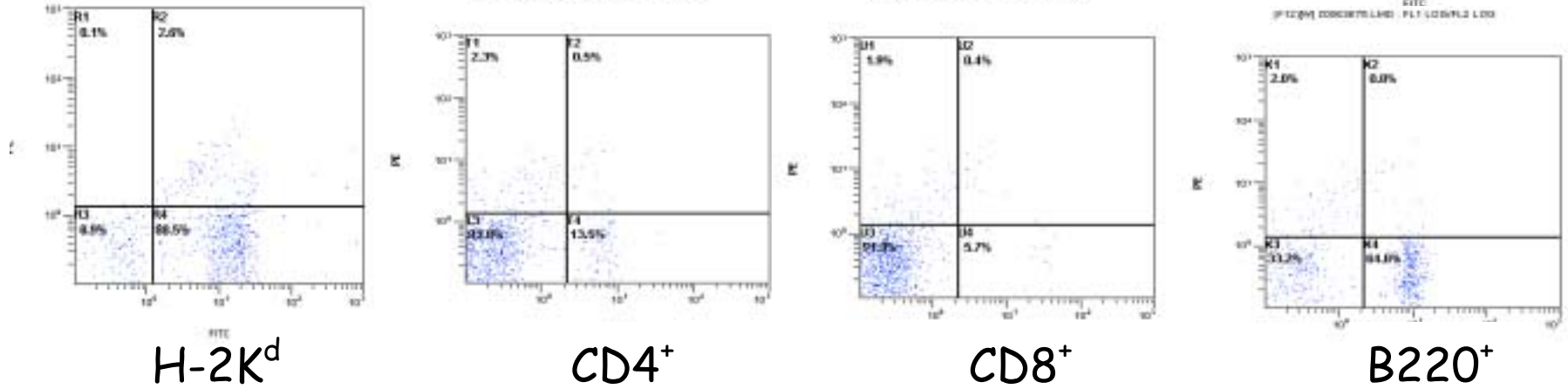
A



B



C

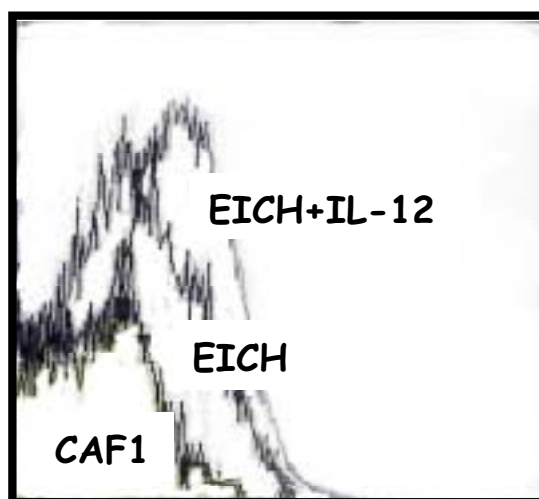


Finalmente, y dado que, como ya indicamos en la introducción, se había descrito la responsabilidad de la IL-12 en regular directamente la sobreexpresión de FAS y FAS-L en células NK y T así como en tener un papel activo en la apoptosis en la EICH y, como por otra parte también hay estudios referidos a la participación de la IL-12 en el efecto contrario, es decir, que la IL-12 no sería capaz de regular la expresión de FAS/FAS-L en células T y sería capaz de proteger a las poblaciones T CD4+ de la apoptosis mediada por FAS, nos propusimos analizar la expresión de FAS en ambos modelos (CAF1+BALB/c no tratado o tratado con IL-12).

El análisis de un número limitado de animales (n=4) a distintos tiempos después de inducir la reacción de ICH (2, 4, 7 días y 6 meses) mostró que existía un aumento de FAS a los 10 días en ambos modelos de EICH tratado y sin tratar (Figura 13).

El valor de la mediana del grupo de animales con EICH fue de 4 veces superior al valor de la mediana del grupo control (CAF1); y el del grupo de animales con EICH tratados con IL-12 fue del doble el valor de CAF1.

Figura 13



5.3 ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL TIMO

En la tabla 9 se indican los porcentajes de timocitos doble negativos, doble positivos y simple positivos obtenidos de los animales de los grupos analizados, detectados (A) al inicio de la enfermedad y (B) a los 6 meses de la misma.

A los dos días de la inyección del estímulo semialogénico, el porcentaje de la población doble negativa disminuyó y el de la CD4⁺ simple positiva incrementó, de manera significativa, respecto al grupo CAF1. Dos días más tarde (a los 4 días de evolución de la enfermedad), estas poblaciones alcanzaron valores normales, y, el porcentaje de las poblaciones doble positivas y CD8⁺ simple positiva, disminuyó e incrementó, respectivamente. A los 7 días post-EICH, se recuperó el porcentaje de la población doble positiva. Y después de 5-6 meses de evolución de la enfermedad, el nivel de esta población volvió a disminuir, recuperando los valores normales el resto de poblaciones con excepción de un ligero incremento de la población doble negativa. Con la coinyección de IL-12, las diferencias observadas más notables fueron un incremento de la población doble negativa a los 4 días de la EICH y disminución de la población doble positiva. A los 6 meses los valores de los porcentajes de las poblaciones eran equivalentes a los del grupo de EICH sin inyectar con IL-12.

Timo	CAF1		EICH			EICH+IL-12			
	-	2d	4d	7d	150-180d	2d	4d	7d	150-180d
	n=24	n=7	n=5	n=5	n=20	n=9	n=5	n=5	n=19
% Thy1.2	69±4.2	88±1.3	49±11	93±1.6	39 ± 4	88±1.7	30±3.5	91±3	39 ± 5.5
% CD4 ⁻ /CD8 ⁻	33±4.5	16±1.6	42±8.8	9.5±1.5	46 ± 4.7	16±1.5	60±4	8±0.8	52 ± 5.7
% CD4 ⁺ CD8 ⁺	48±3.8	53±3.9	24±8.8	53±4.2	29 ± 4	54±3.3	11±3	51±10	27 ± 3.6
% CD4 ⁺ CD8 ⁻	10±1.6	19±2	12±1.6	21±0.2	13 ± 1.6	16±0.8	11±2.5	24±7	12 ± 1.8
% CD4 ⁻ /CD8 ⁺	8±0.7	12±1.9	21±3.3	17±2	12 ± 1.5	13±2	18±3.8	17±2.5	9 ± 1.6

Tabla 9. Efecto de la IL-12 sobre las diferentes poblaciones linfocitarias del timo en ratones con EICH. Se extrajo el timo de los ratones a los 2, 4, 7 y 150-180 días después de la inducción de la enfermedad, y se analizaron las diferentes poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Los resultados expresan la media del grupo (5-20 animales/grupo)± Error St.

5.4 QUIMERISMO PARENTAL EN EL TIMO DE RATONES INDUCIDOS

El grado de quimerismo detectado en el timo de los animales analizados se muestra en la tabla 10, expresado en tanto por ciento.

Timo	Días post EICH	n	H-2k ^{d/d}
GVHD	2	7	2.2 ± 2.4
	4	5	7.3 ± 4,9
	7	5	1,6 ± 1,8
	150	20	13 ± 9,8
GVHD+IL-12	2	9	1.7 ± 1.4
	4	5	8,4 ± 9.2
	7	5	4,9 ± 6,2
	150	19	22,6 ± 19.7

Tabla 10. Efecto de la IL-12 sobre las diferentes poblaciones linfocitarias del timo en ratones con EICH. Se extrajo el timo de los ratones en los tiempos indicados después de la inducción de la enfermedad, y se determinó el grado de quimerismo mediante citometría de flujo tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Los resultados expresan la media del grupo (5-20 animales/grupo) ± Error St.

Aunque es difícil hablar de quimerismo en este órgano dado la dificultad de discernir entre la población que proviene del donante de la de origen del huésped, debido a la baja expresión de antígenos de clase I en animales normales, cabe mencionar, que durante el período inicial de

seguimiento de la enfermedad, detectamos una pequeña población donante en ambos modelos de EICH semialogénica, que incrementó hasta un $13,13 \pm 2,32$ % del total de timocitos en los animales huéspedes analizados del grupo CAF1+BALB/c y hasta un $22,59 \pm 4,6$ % en los animales del grupo CAF1+BALB/c+IL-12, después de 5-6 meses de evolución de la enfermedad. Aunque las diferencias no fueron significativas entre ambos grupos, los porcentajes más elevados de quimerismo correspondieron al grupo de animales que recibió la IL-12.

En la figura 15 se muestra un experimento representativo del quimerismo detectado en estos grupos de animales.

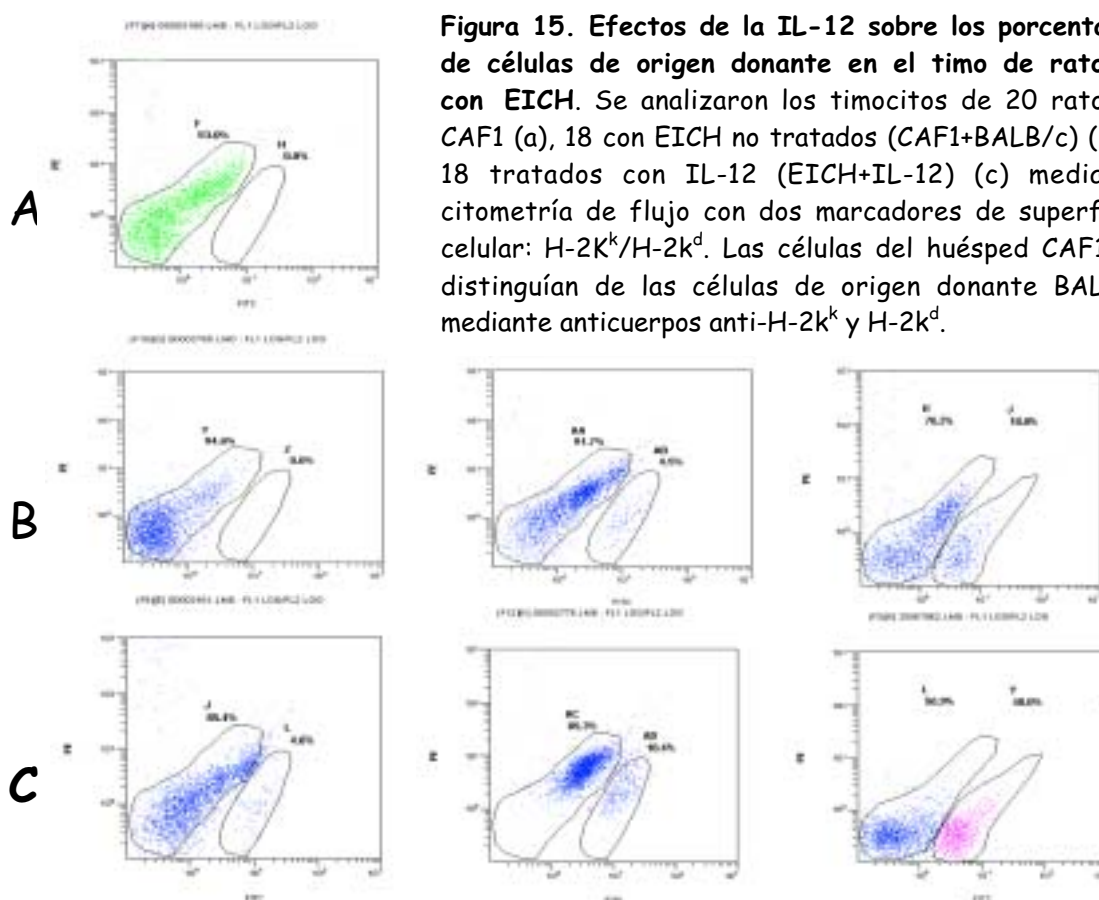


Figura 15. Efectos de la IL-12 sobre los porcentajes de células de origen donante en el timo de ratones con EICH. Se analizaron los timocitos de 20 ratones CAF1 (a), 18 con EICH no tratados (CAF1+BALB/c) (b) y 18 tratados con IL-12 (EICH+IL-12) (c) mediante citometría de flujo con dos marcadores de superficie celular: H-2K^k/H-2K^d. Las células del huésped CAF1 se distinguían de las células de origen donante BALB/c mediante anticuerpos anti-H-2K^k y H-2K^d.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En trabajos anteriores demostramos que la enfermedad crónica de injerto contra el huésped (EICHc) inducida en ratones CAF1 inyectados con células semialogénicas BALB/c proporcionaba un modelo para el estudio del desarrollo de aspectos clínicos mixtos de enfermedades del tejido conectivo, particularmente lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide (AR) (Kim y col., 2000; Okubo y col., 1999). Los animales huésped presentaban autoanticuerpos (ANAs, anti-ADNdc, anti-histonas) y signos de glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos, aspectos que caracterizan al LES. Además, a partir de 10 meses post-inducción de la EICH el 70% desarrollaban cambios anatomopatológicos acompañados en algunos casos de signos clínicos de artritis y alteraciones de la inmunidad humoral asociada, como los FR característicos también de la AR humana. Además también aparecían otros signos clínicos de autoinmunidad sistémica como alopecia y vasculitis (Gelpi y col., 1990; Pals y col., 1985).

En este modelo, donante y receptor difieren en antígenos de clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Contrario a lo que acontece en otras cepas de ratones con diferencias en clase I y II, en el modelo CAF1+BALB/c, estas diferencias, no fueron suficientes para provocar la inducción de la forma aguda de la EICH (Rolink y col., 1983), que se caracteriza por la presencia de hipoplasia severa del sistema linfohematopoyético, anemia aplásica e hipogamaglobulinemia, y cambio en la arquitectura del timo (Krenger y col., 2000).

En el presente trabajo nos propusimos analizar el papel de la

citoquina IL-12 en el modelo de EICH crónica susceptible a padecer LES y artritis, CAF1+BALB/c, tanto en el inicio de la respuesta del injerto contra el huésped como durante el desarrollo de la misma.

Los resultados que hemos obtenido en este trabajo demuestran que el tratamiento *in vivo* del modelo CAF1+BALB/c con la citoquina IL-12, promotora de la respuesta Th1, aminora el desarrollo de la EICH crónica sin la aparición de ningún signo clínico de la forma aguda de la EICH y previene el desarrollo de proteinuria y glomerulonefritis, acelera la presencia en suero de ANAs y no acelera o incrementa la aparición de ningún signo clínico de artritis. Además, este tratamiento altera el balance hacia una respuesta de células predominantemente Th1 sin inhibir las respuestas Th2. Concretamente, observamos que el tratamiento con IL-12 al inicio de la enfermedad de ICH desarrollada en el modelo CAF1+BALB/c incrementa la expresión de citoquinas Th1-dependiente (IL-2, IFN- γ) y la inflamatoria IL-6, disminuye los niveles de expresión de citoquinas Th2-dependiente (IL-10, IL-15) y suprime la Th2-dependiente IL-4. También incrementa la expresión de IL-13, citoquina descrita como Th2-dependiente aunque también puede ser producida por células Th1 (Hasegawa y col., 1997; de Vries, 1998; Oriente y col., 2000). En el estudio realizado después de 6 meses de evolución de la enfermedad, la IL-12 incrementa en sobrenadantes de esplenocitos los niveles de IFN- γ e IL-6 sin disminuir los niveles de IL-4 e IL-10. Tampoco se observaron cambios significativos en la producción de IL-2 con el tratamiento de IL-12. Finalmente, el estudio de citometría reveló que el tratamiento con IL-12 causaba un incremento en la población doble negativa a los 2 días de evolución de la enfermedad seguido de un incremento de células T principalmente CD8⁺. Dicha población CD8⁺ a los 6

meses de evolución de la enfermedad procedía en su totalidad de la población donante dando lugar a un importante quimerismo en los tejidos linfoides del huésped.

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que demuestra que una única administración de IL-12 exógena, simultáneamente a la transferencia de células parentales, aminora los aspectos inmunológicos asociados con la enfermedad crónica del injerto contra el huésped sin la inducción de la forma aguda de la enfermedad en el modelo no irradiado p F1. Estos resultados fueron inesperados teniendo en cuenta que la IL-12 es una citoquina que induce una respuesta Th1 (Marshall y col., 1995; Schmitt y col., 1994) y actividad citotóxica (CTL) (Gately y col., 1998), ambos considerados como los principales inductores y mediadores de la destrucción tisular asociada con la forma aguda de la enfermedad y el rechazo del injerto. En la literatura existen datos contradictorios a los observados en esta tesis y datos que concuerdan. Como datos discordantes, cabe mencionar los trabajos de Williamson en 1996 acerca del papel de la IL-12 en la polarización de la EICH mediante la administración o depleción de IL-12 en ambas formas aguda y crónica de la EICH en ratones BDF1. Contrariamente a lo que hemos observado en la cepa CAF1, sus resultados demostraron que la administración de IL-12 recombinante murina agrava la enfermedad y convierte la EICH crónica en un síndrome que recuerda la forma aguda de la misma. Como datos concordantes, caben mencionar los trabajos de Okubo en 1999 que demostraron que administrando IL-12 codificada en un plásmido de DNA, en el modelo de EICH crónica DBA/2+DBF1 se aminoraba la forma crónica de la enfermedad sin que se

desarrollase un cuadro agudo (Okubo y col., 1999).

Una hipótesis a la no inducción de la forma aguda de la enfermedad estaría en una baja frecuencia de precursores parentales CTL anti-F1.

Via y colaboradores demostraron, en un modelo murino de EICH semialogénico (C57BL/6 X DBA/2 + DBA/2) que esplenocitos procedentes de animales C57BL/6 muestran una frecuencia de precursores CTL de 1/1450 contra células DBF1 e inducen una EICH aguda, mientras que los esplenocitos DBA/2 tienen una frecuencia de precursores CTL de 1/13500 contra células DBF1 e inducen una EICH crónica, indicando un papel de las células CD8⁺ en el desarrollo de la forma aguda de la enfermedad. (Via y col., 1987). También se ha observado una frecuencia 9 veces superior en la respuesta CTL de animales B6 contra el huésped H-2^{d/b} (indistintamente de la procedencia del alelo H-2^d del huésped: DBA/2 o BALB/c) a la frecuencia en la respuesta CTL de DBA/2 y BALB/c contra células H-2^{d/b} (Tschetter y col., 2000). Anteriormente, en el laboratorio, Vidal y colaboradores demostraron también una menor respuesta citotóxica de células efectoras BALB/c frente a dianas CAF1, respecto a células efectoras A/J. (Vidal y col., 1996).

Diferencias a nivel del complejo menor de histocompatibilidad podrían también influir en la determinación final de una u otra forma de la EICH. Entre estos antígenos menores se encuentran los Ag MIs que son superantígenos codificados por retrovirus murinos endógenos que estimulan una elevada porción de células T con un TCR específico de la familia V . Células DBA/2 poseen MIs 1^a, un antígeno MIs fuerte que estimula el TCR V 6 y 8.1 y no está presente sobre las células BALB/c. Las células

portadoras de dicho antígeno responden al antígeno mediante una respuesta Th1. Es posible que la fuerte respuesta de C57BL/6 anti-Mls 1^o del DBA/2 sea suficiente para iniciar y mantener la respuesta de citoquinas necesaria para que se produzca la reacción citotóxica, mientras que la débil expresión del antígeno Mls por células BALB/c sea adecuado para iniciar pero no mantener la forma aguda mediada por citotoxicidad. (Tschetter y col., 2000).

La no progresión hacia un fenotipo agudo de la EICH en los ratones CAF1 que hemos analizado después del tratamiento con la IL-12, podría también atribuirse a un ligero incremento en la actividad citotóxica CTL, NK y Veto, respecto al modelo inicial CAF1+BALB/c, pero sustancial respecto al grupo control CAF1, insuficiente para destruir los tejidos del huésped probablemente debido a la capacidad reguladora de las células Veto del huésped (anti-BALB/c) que, podrían propiciar el anidamiento posterior de las células donantes como se observa en el estudio de la autopsia realizado a los 5-6 meses de seguimiento de la enfermedad.

Otra posible explicación a la prevención de la conversión hacia un fenotipo agudo de la EICH inducida en ratones CAF1 coinyectados con IL-12 podría también estar relacionada con los niveles elevados de IFN- detectados en estos ratones. Pese a que en efecto hay estudios que demuestran la implicación del IFN- en procesos patofisiológicos de la enfermedad del ICH (Allen y col., 1993; Szebeni y col., 1994), paradójicamente, esta citoquina es también capaz de inhibirla (Brok y col., 1993; Murphy y col., 1998; Dey y col., 1998; Yang and Sykes, 1999). Además,

hay autores que han sugerido otra posibilidad de prevenir la forma aguda de la EICH independiente de IFN- γ . Así por ejemplo, está demostrado que la utilización de ratones knockout para IFN- γ como donantes en ambos modelos de EICH aguda, BALB/c C57BL/6 o C57BL/6 B10.BR, acelera la morbilidad asociada a ésta (Murphy y col., 1998). Además, Young, Y.G. y colaboradores demostraron que una única inyección de IL-12 el mismo día que el trasplante de células de médula ósea alogénico procedente de la cepa A/J inhibía la EICH aguda en ratones C57BL/10 (B10, H-2^b) irradiados letalmente (Sykes y col., 1995; Yang y col., 1997). La manera cómo la IL-12 ejerce su efecto protector depende de la habilidad de las células donantes a producir IFN- γ (Yang y col., 1998). Estos autores sugieren que al menos en el modelo que ellos analizan, la IL-12 es insuficiente para inducir por sí sola una EICH aguda, para causar patología, y podría necesitar una combinación con otra/s citoquina/s, como por ejemplo la IL-18 (Tomura y col., 1998; Fantuzzi y col., 1999). Un hecho similar podría también tener lugar en el modelo descrito en esta tesis.

Los estudios acerca del mecanismo mediante el cual la IL-12 ejerce paradójicamente un efecto inhibitorio sobre la EICH aguda, demuestran que este efecto está asociado con la inhibición de la expansión y activación de células Th donantes normalmente asociadas al modelo de EICH. Después de 4 días de la inducción de la forma aguda de la enfermedad en el modelo A/J C57BL/10SnCR, así como también en el modelo A/J C57BL/6, existe una marcada reducción de esplenocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ en los ratones que además fueron tratados con IL-12 comparado con los que no recibieron este tratamiento. (Sykes y col., 1995; Dey y col., 1998; Yang and Sykes, 1999).

En esta tesis, el análisis de citometría realizado muestra una

disminución significativa en el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ debida al estímulo semialogénico a los 2-4 días de la administración del injerto, que se recuperan a los 7 días post-inducción de la enfermedad. Con la administración de IL-12 no hay diferencias, excepto en el porcentaje de células CD8⁺ que se recuperó ya a los 4 días de evolución de la enfermedad. Sin embargo el modelo discutido en esta tesis no muestra cuadro agudo en ningún caso.

Esta disminución en el porcentaje del total de células T observada en el grupo de EICH sin tratar respecto al grupo control CAF1 entre los 2-4 días de evolución de la enfermedad se debe a un aumento en el número de células pertenecientes a la población no marcada, indicativo del aumento de la proliferación que resulta después del estímulo semialogénico. Por el contrario, con el tratamiento con IL-12 la disminución en el porcentaje de estas poblaciones puede ser un reflejo de la muerte por apoptosis, bien de las células del huésped, bien de las células donantes, de la población CD4⁺, que prosigue a la activación de células T, además del aumento de la población sin marcar, aunque los resultados tanto de expresión de Fas como de actividad citotóxica no son estadísticamente significativos.

Del análisis de la citometría de flujo de los esplenocitos activados *in vivo* en el presente trabajo encontramos relevante las siguientes observaciones:

En primer lugar, la población de linfocitos T del huésped fue la primera que proliferó en fases tempranas de la enfermedad en el modelo CAF1+BALB/c también en presencia de IL-12. Resultados similares se han

encontrado en otros modelos de EICH crónica (Gleichmann and Gleichmann, 1984; Sprent y col., 1990) y en modelos de EICH tratados con IL-12 (Via y col., 1994). En el modelo CAF1+BALB/c+IL-12 la presencia en el huésped de linfocitos T CD8⁺ de origen donante fue $17 \pm 2.27\%$ después de 7 días y $10 \pm 0.67\%$ después de 5 meses de evolución de la enfermedad. Queremos resaltar que la totalidad de T CD8⁺ detectados fueron de origen donante en esta fase tardía de la enfermedad. Sin embargo, en ratones huésped del modelo CAF1+BALB/c los T CD8⁺ procedían de ambos orígenes, donante y huésped.

Consideramos que la presencia de células CD8⁺ donantes además de las células CD4⁺ donantes podrían contribuir al incremento temprano en la proliferación espontánea de las células del bazo en respuesta al estímulo alogénico, como ya fue descrito anteriormente (Vidal y col., 1996).

En segundo lugar, un incremento en la población negativa para los cuatro anticuerpos monoclonales utilizados (Thy1⁺, CD8⁺, CD4⁺ y B220⁺) en las fases tempranas de la enfermedad en el modelo CAF1+BALB/c comparado con ratones CAF1 normales. La IL-12 induce claramente un incremento de esta población que es más elevada después de 4 días de la inducción de la EICH, disminuyendo a los 7 días de evolución de la enfermedad. Hay una estrecha relación entre la presencia de esta población negativa y los niveles de IFN- así como también de la actividad citolítica de células NK. Aunque postulamos que esta población negativa pertenecería a linfocitos NK no fuimos capaces de detectar ninguna reacción específica significativa mediante citometría de flujo con los anticuerpos monoclonales disponibles.

En tercer lugar, se observó un incremento significativo en el grado de

quimerismo de células donantes en el bazo de animales inyectados con IL-12 a la vez que el estímulo semialogénico, probablemente como consecuencia de una actividad citotóxica producida por linfocitos T CD8⁺ donantes. En datos publicados previamente (Vidal y col., 1996) ya demostramos que el quimerismo de células donantes era dependiente de la presencia de células T CD8⁺ en el inóculo donante.

Además, y referente a los cambios que tienen lugar en las fases tempranas de la enfermedad, el análisis funcional de la actividad NK después de 10 días de la inducción de la EICH muestra una actividad con tendencia a ser más elevada en el grupo de animales con la EICH tratados con IL-12 que en los no tratados, siendo en ambos grupos más elevada que en los animales CAF1 control. Aunque no de manera significativa, el quimerismo también incrementó en timo cuando la IL-12 fue inyectada 1h antes a la inyección del estímulo semialogénico. Esta migración de células donantes hacia el timo puede producir una maduración de células T y una ontogenia anómala, que podría estar implicada en los procesos de tolerancia. Las T CD8⁺ citotóxicas donantes podrían ser las responsables de la desaparición progresiva de células F1 y del consiguiente elevado nivel de quimerismo.

En este punto hay que decir que en artículos previos, los porcentajes de quimerismo de células donantes son más elevados que los indicados en el presente trabajo así como también los porcentajes de la población negativa (Vidal y col., 1996). Estos cambios podrían deberse a cambios en la sensibilidad del citómetro utilizado en ambos casos o diferencias en el origen de los animales.

Otro resultado significativo, observado en los animales tratados con IL-12 analizados en la presente tesis, es la ausencia de proteinuria y glomerulonefritis durante los 5-6 meses de seguimiento de la enfermedad en contraposición con el 30% encontrado, en este mismo período, en el modelo sin tratar. Estos resultados concuerdan con los datos observados en el estudio realizado por Hagiwara E y colaboradores donde demostraron que la administración de un plásmido que codifica IL-12 murina en ratones MRL/lpr, puede tener un impacto beneficioso sobre las manifestaciones inmunológicas de la enfermedad compatible con lupus que desarrollan estos animales. En particular, los niveles de autoanticuerpos anti-ADN, la linfadenopatía, la esplenomegalia y la acumulación de linfocitos anormales CD4⁻CD8⁻, disminuyen significativamente con la terapia del plásmido IL-12. Estos cambios estarían asociados con una modesta mejoría en la proteinuria y en la glomerulonefritis.

Varios autores (Prud'homme y col., 1995; Schorlemmer y col., 1995; Tsai y col., 1995) describen el lupus murino como una enfermedad predominantemente Th2-dependiente. Sin embargo, el análisis de los inmunocomplejos depositados en el riñón de estos animales mostraba la presencia de isotipos de inmunoglobulinas predominantemente Th1-dependiente. Además, algunos investigadores describen que en el modelo MRL/lpr la enfermedad se caracteriza por la sobreproducción de citoquinas Th1 y que la IL-12 recombinante podría acelerarla (Takahashi y col., 1996; Balomenos y col., 1998; Gomez y col., 2004). También existen datos que sugieren la participación mutua de ambos tipos de citoquinas. Por ejemplo, Peng y colaboradores en 1997 demostraron que IFN- γ e IL-4 juegan papeles opuestos pero prescindibles en el desarrollo de la autoinmunidad. Estos

mismos autores también encuentran que knockouts de IFN- γ e IL-4 previenen de una linfadenopatía pero no de la enfermedad renal (ej, glomerulonefritis) en cepas de ratones MRL/lpr. Estos datos sugieren que los mecanismos responsables para el desarrollo de linfadenopatía y esplenomegalia probablemente difieren de los asociados con proteinuria y glomerulonefritis; datos obtenidos por Csiszar A y colaboradores apoyan la idea de que el aumento en la producción de IFN- γ a partir de células mononucleares puede provocar respuestas inflamatorias, junto al aumento en la producción de IL-10 asociado a la producción de autoanticuerpos por células B en pacientes con LES (Csiszar y col., 2000); Kawasaki y colaboradores demuestran una implicación de ambos patrones de citoquinas en pacientes con nefritis lúpica (Kawasaki y col., 2004).

En nuestra experiencia podemos decir que el modelo CAF1+BALB/c presenta ambos tipos de respuestas Th1 y Th2, y que el 20% de los animales presentaban glomerulonefritis a los 5 meses de haber inducido la EICH (Gelpi y col., 1990). Vidal y colaboradores demostraron que el mismo modelo inducido con la población donante deplecionada de células TCD8⁺ (Vidal y col., 1996), se caracterizaba por un incremento de la citoquina Th2-dependiente IL-4, un aumento de autoanticuerpos y la muerte de los animales al mes de la inducción de la enfermedad a causa de glomerulonefritis. En esta tesis se demuestra que, el tratamiento con IL-12, provoca un incremento de citoquinas Th1-dependiente (IFN- γ , IL-6) aunque sin inhibir de manera considerable las Th2-dependientes y condujo a la no aparición de signo alguno de enfermedad renal al menos durante los 5-6 meses de seguimiento de la enfermedad. También queremos resaltar que en el 50% de los animales que recibieron IL-4 pertenecientes al grupo control

Th2-dependiente, desarrolló signos de enfermedad renal. Concluimos que en este modelo el cuadro de enfermedad renal dependería de una respuesta Th2 y que un sesgo Th1-dependiente sería beneficioso.

Finalmente y contrario a lo que esperábamos, el tratamiento con IL-12 no aceleró ni incrementó ningún signo clínico de artritis en el modelo CAF1+BALB/c. La AR es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune que se puede definir como poliartritis sistémica asociada a inflamación y dolor de articulaciones múltiples. Una vez se inicia la AR hay una inducción local de inmunidad innata que da lugar a la inflamación de la membrana sinovial (Sweeney and Firestein, 2004a). En condiciones normales la sinovia es una estructura relativamente acelular con una capa íntima compuesta por macrófagos y células fibroblásticas denominadas sinoviocitos. En la AR, dicha membrana se vuelve hiperplásica debido a un incremento de dichas células. Los macrófagos activados secretan un rango de citoquinas, entre las que cabe mencionar interleukina-1, IL-6, IL-12, TNF- y quimioquina IL-8, que ejercen una variedad de efectos a nivel local y sistémicos que contribuyen a la inmunidad, innata y adaptativa. Los efectos locales de la IL-6 pueden resumirse en activación de linfocitos e incremento en la producción de anticuerpos y además, se le ha atribuido un papel inflamatorio en la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes (Feldmann y col., 1996; Takagi y col., 1998; Samoilova y col., 1998; Choy y col., 2002). En el presente estudio, se demuestra la presencia de IL-6 en sobrenadantes de esplenocitos de los ratones con EICH tratados con IL-12, a los 6 meses de la inducción de la EICH y también incremento de la expresión de ARNm a los 4-7 días de la inducción, sin embargo ninguno de estos animales manifestó

clínicamente signos asociados a la artritis, y sólo uno desarrolló FR (correspondiente al que presentaba en suero el valor más alto de IL-6).

En nuestra opinión la IL-12 probablemente activaría células NK e induciría la diferenciación de células T CD4⁺ hacia un fenotipo Th1.

Fowell y colaboradores (Fowell y col., 1998), comparando células procedentes de las diferentes cepas murinas, describieron que las células T CD4⁺ activadas procedentes de ratones BALB/c muestran una tendencia hacia la producción de IL-4 y hacia un compromiso Th2.

Por otro lado, el tratamiento con IL-12 en el presente modelo juega un papel central en la polarización de respuestas dependientes de células Th hacia el fenotipo Th1:

Consideramos que la inyección de IL-12 en el modelo de EICH crónica CAF1+BALB/c, culmina en un mecanismo citotóxico contra las células del huésped, regulado por el efecto ejercido por las células Veto del huésped y permitiendo la repoblación en tejidos del huésped por células donantes. Via y colaboradores (1994) también describen la imposibilidad de revertir totalmente la enfermedad crónica de ICH inducida en un modelo murino después del tratamiento con IL-12. Los datos de esta tesis así como los publicados por Via y colaboradores sugieren que este tratamiento probablemente debería haberse administrado antes del establecimiento de una respuesta Th2 para modificar dicha respuesta o inducir actividad citotóxica. En ambos modelos se demuestra una predisposición hacia una respuesta Th2 preestablecida. (Via y col., 1994). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la ausencia de algunos efectos esperados de la IL-12, como son la inducción de una EICH aguda o un efecto sobre las lesiones articulares, hayan tenido lugar debido a la dosis de IL-12 empleada

y/o al régimen de tratamiento utilizado en nuestros experimentos.

Llama la atención en el presente estudio la heterogeneidad de resultados entre los animales de un mismo grupo a nivel de expresión clínica y parámetros inmunológicos. Estos datos que resultarían paradójicos, ya que todos los animales del estudio eran genéticamente iguales, tenían la misma edad y sexo y recibieron el mismo número y poblaciones de células parentales, ya había sido observado en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio, así como en animales de la cepa autoinmune de ratones MRL, en la cual sólo el 25% de los animales desarrollaban Ac anti-Sm, y no todos presentaban enfermedad articular, siendo todos ellos genéticamente iguales (Shores y col., 1986).

Por otra parte, experiencias inmunológicas previas de los animales, y los distintos fenómenos de diversificación de receptores de linfocitos T y B podrían determinar el distinto comportamiento de los miembros de un mismo grupo. Gast y colaboradores propusieron ya en 1987, que las distintas infecciones sufridas por el huésped o los virus inducidos por mediación de la reacción de ICH podrían ser responsables del tipo de EICH que se desarrollase después del trasplante. Estos mismos autores, más lejos en su hipótesis, postularon que la EICH aguda y crónica tienen una misma etiología y que la clínica es distinta dependiendo de la selección del órgano diana. En el agudo el órgano diana serían las células epiteliales y en el crónico serían las células del tejido conjuntivo y las células epiteliales. Las infecciones que había sufrido el huésped antes o después del trasplante favorecerían la aparición del cuadro agudo o del cuadro crónico. (de Gast y col., 1987).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El modelo murino de enfermedad crónica del injerto contra el huésped (EICHc) previamente caracterizado, CAF1+BALB/c, está mediado por una respuesta mixta de las subpoblaciones de células T CD4⁺ Th1 y Th2.
2. El tratamiento *in vivo* con IL-12 de la enfermedad crónica del injerto contra el huésped (EICHc) inducida en dicho modelo murino provoca un sesgo en la población de células T CD4⁺ hacia una respuesta predominantemente Th1.
3. Esta polarización hacia una respuesta predominantemente Th1, aminora el desarrollo de la forma crónica de la EICH en dicho modelo y no es suficiente para que tenga lugar la progresión hacia un fenotipo agudo de la EICH a pesar de las diferencias en el MHC de clase I y II presentes entre donante y receptor.
4. El tratamiento con IL-12 previene el desarrollo de proteinuria y glomerulonefritis que caracteriza este modelo murino de EICH.
5. El tratamiento con IL-12 no acelera ni incrementa la aparición de ningún signo clínico de artritis reumatoide en este modelo susceptible a padecer esta enfermedad del tejido conectivo.
6. La IL-12 interviene en la eliminación de la mayoría de células TCD8⁺ del receptor permitiendo la repoblación del huésped con células BALB/c del donante.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aarvak, T., Chabaud, M., Thoen, J., Miossec, P., Natvig, J. B., 2000. Changes in the Th1 or Th2 cytokine dominance in the synovium of rheumatoid arthritis (RA): a kinetic study of the Th subsets in one unusual RA patient. *Rheumatology (Oxford)*. **39**: (5): 513-22.

Adachi, M., Suematsu, S., Suda, T., Watanabe, D., Fukuyama, H., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N., Nagata, S., 1996. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: (5): 2131-6.

Adorini, L. and Trembleau, S., 1997. Immune deviation towards Th2 inhibits Th-1-mediated autoimmune diabetes. *Biochem Soc Trans*. **25**: (2): 625-9.

Adorini, L., 2003. Cytokine-based immunointervention in the treatment of autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol*. **132**: (2): 185-92.

Akizuki, M., Reeves, J. P., Steinberg, A. D., 1978. Expression of autoimmunity by NZB/NZW marrow. *Clin Immunol Immunopathol*. **10**: (3): 247-50.

Alarcon-Segovia, D. and Llorente, L., 1983. Antibody penetration into living cells. IV. Different effects of anti-native DNA and anti-ribonucleoprotein IgG on the cell cycle of activated T gamma cells. *Clin Exp Immunol*. **52**: (2): 365-71.

Allen, R. D., Staley, T. A., Sidman, C. L., 1993. Differential cytokine expression in acute and chronic murine graft-versus-host-disease. *Eur J Immunol*. **23**: (2): 333-7.

Andrews, B. S., Eisenberg, R. A., Theofilopoulos, A. N., Izui, S., Wilson, C. B., McConahey, P. J., Murphy, E. D., Roths, J. B., Dixon, F. J., 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med*. **148**: (5): 1198-215.

Arnett, F. C., Reveille, J. D., Valdez, B. C., 1997. Autoantibodies to a nucleolar RNA helicase protein in patients with connective tissue diseases.

Arthritis Rheum. **40**: (8): 1487-92.

Augener, W., Grey, H. M., Cooper, N. R., Muller-Eberhard, H. J., 1971. [Reaction between the first component C1 of the complement system and immunoglobulins in relation to their class, subclass and physical condition]. *Verh Dtsch Ges Inn Med.* **77**: 1163-5.

Balomenos, D., Rumold, R., Theofilopoulos, A. N., 1998. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest.* **101**: (2): 364-71.

Benavides, F. and Guenet, J. L., 2001. [Murine models for human diseases]. *Medicina (B Aires).* **61**: (2): 215-31.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., Sinigaglia, F., 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.* **187**: (1): 129-34.

Bradley, L. M., Dalton, D. K., Croft, M., 1996. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol.* **157**: (4): 1350-8.

Brinkman, K., van Dam, A., van den Brink, H., Termaat, R. M., Berden, J., Smeenk, R., 1990. Murine monoclonal antibodies to DNA. A comparison of MRL/lpr NZB/W and chronically graft-versus-host-diseased mice. *Clin Exp Immunol.* **80**: (2): 274-80.

Brok, H. P., Heidt, P. J., van der Meide, P. H., Zurcher, C., Vossen, J. M., 1993. Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Immunol.* **151**: (11): 6451-9.

Burastero, S. E., Rossi, G. A., Crimi, E., 1998. Selective differences in the expression of the homing receptors of helper lymphocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol.* **89**: (2): 110-6.

Burkhardt, H., Koller, T., Engstrom, A., Nandakumar, K. S., Turnay, J., Kraetsch, H. G., Kalden, J. R., Holmdahl, R., 2002. Epitope-specific

recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis Rheum.* **46**: (9): 2339-48.

Carlsen, S., Hansson, A. S., Olsson, H., Heinegard, D., Holmdahl, R., 1998. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol.* **114**: (3): 477-84.

Carmona, L., Villaverde, V., Hernandez-Garcia, C., Ballina, J., Gabriel, R., Laffon, A., 2002. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford).* **41**: (1): 88-95.

Caspi, R. R., 1998. IL-12 in autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol.* **88**: (1): 4-13.

Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., D'Andrea, A., Ma, X., Trinchieri, G., 1995. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol.* **25**: (1): 1-5.

Cathcart, E. S., Hayes, K. C., Gonnerman, W. A., Lazzari, A. A., Franzblau, C., 1986. Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen. *Lab Invest.* **54**: (1): 26-31.

Chang, C. H., Sun, J. S., Hou, S. M., 1998. Wrist arthrodesis using a slab bone graft from the dorsal radius. *J Formos Med Assoc.* **97**: (5): 335-8.

Chatenoud, L., Salomon, B., Bluestone, J. A., 2001. Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev.* **182**: 149-63.

Choy, E. H., Isenberg, D. A., Garrood, T., Farrow, S., Ioannou, Y., Bird, H., Cheung, N., Williams, B., Hazleman, B., Price, R., Yoshizaki, K., Nishimoto, N., Kishimoto, T., Panayi, G. S., 2002. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.* **46**: (12): 3143-50.

Clark, W. F., Dau, P. C., Euler, H. H., Guillevin, L., Hasford, J., Heer, A. H., Jones, J. V., Kashgarian, M., Knatterud, G., Lockwood, C. M. et al., 1991.

Plasmapheresis and subsequent pulse cyclophosphamide versus pulse cyclophosphamide alone in severe lupus: design of the LPSG trial. Lupus Plasmapheresis Study Group (LPSG). *J Clin Apheresis*. **6**: (1): 40-7.

Conboy, I. M., DeKruyff, R. H., Tate, K. M., Cao, Z. A., Moore, T. A., Umetsu, D. T., Jones, P. P., 1997. Novel genetic regulation of T helper 1 (Th1)/Th2 cytokine production and encephalitogenicity in inbred mouse strains. *J Exp Med*. **185**: (3): 439-51.

Constant, S. L. and Bottomly, K., 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*. **15**: 297-322.

Cope, A. P., 2003. Exploring the reciprocal relationship between immunity and inflammation in chronic inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **42**: (6): 716-31.

Cornacoff, J. B., Hebert, L. A., Smead, W. L., VanAman, M. E., Birmingham, D. J., Waxman, F. J., 1983. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest*. **71**: (2): 236-47.

Cornelis, F., Hardwick, L., Flipo, R. M., Martinez, M., Lasbleiz, S., Prud'homme, J. F., Tran, T. H., Walsh, S., Delaye, A., Nicod, A., Loste, M. N., Lepage, V., Gibson, K., Pile, K., Djoulah, S., Danze, P. M., Liote, F., Charron, D., Weissenbach, J., Kuntz, D., Bardin, T., Wordsworth, B. P., 1997. Association of rheumatoid arthritis with an amino acid allelic variation of the T cell receptor. *Arthritis Rheum*. **40**: (8): 1387-90.

Courtenay, J. S., Dallman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A., Mosedale, B., 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. **283**: (5748): 666-8.

Cremer, M. A., Ye, X. J., Terato, K., Owens, S. W., Seyer, J. M., Kang, A. H., 1994. Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat. Characterization of cellular and humoral immune responses to native types XI, V, and II collagen and constituent alpha-chains. *J Immunol*. **153**: (2): 824-32.

Csiszar, A., Nagy, G., Gergely, P., Pozsonyi, T., Pocsik, E., 2000. Increased interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with

systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol.* **122**: (3): 464-70.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M., Trinchieri, G., 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* **178**: (3): 1041-8.

Davies, K. A., Peters, A. M., Beynon, H. L., Walport, M. J., 1992. Immune complex processing in patients with systemic lupus erythematosus. In vivo imaging and clearance studies. *J Clin Invest.* **90**: (5): 2075-83.

de Gast, G. C., Verdonck, L. F., Dekker, A. W., Mudde, G. C., 1987. Transplantation of marrow from donors other than genotypically HLA-identical siblings. *Neth J Med.* **31**: (1-2): 77-82.

de Vries, J. E., 1998. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol.* **102**: (2): 165-9.

De Wit, D., Van Mechelen, M., Zanin, C., Doutrelepont, J. M., Velu, T., Gerard, C., Abramowicz, D., Scheerlinck, J. P., De Baetselier, P., Urbain, J. et al., 1993. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction. *J Immunol.* **150**: (2): 361-6.

Dey, B. R., Yang, Y. G., Szot, G. L., Pearson, D. A., Sykes, M., 1998. Interleukin-12 inhibits graft-versus-host disease through an Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T-cell activation and expansion. *Blood.* **91**: (9): 3315-22.

Diamond, B., Katz, J. B., Paul, E., Aranow, C., Lustgarten, D., Scharff, M. D., 1992. The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. *Annu Rev Immunol.* **10**: 731-57.

Druet, P., Sheela, R., Pelletier, L., 1995. Th1 and Th2 cells in autoimmunity. *Clin Exp Immunol.* **101 Suppl 1**: 9-12.

Elias, B., Boros, G., Albert, M., Tuboly, S., Gergely, P., Papp, L., Barna Vetro, I., Rafai, P., Molnar, E., 1990. Clinical and pathological effects of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida*

in specific-pathogen-free piglets. *Nippon Juigaku Zasshi*. **52**: (4): 677-88.

Fantuzzi, G., Reed, D. A., Dinarello, C. A., 1999. IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. *J Clin Invest*. **104**: (6): 761-7.

Farrar, J. D., Asnagli, H., Murphy, K. M., 2002. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest*. **109**: (4): 431-5.

Feldmann, M., Brennan, F. M., Maini, R. N., 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell*. **85**: (3): 307-10.

Feldmann, M., 2001. Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol*. **2**: (9): 771-3.

Firestein, G. S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. **423**: (6937): 356-61.

Ford, M. S., Young, K. J., Zhang, Z., Ohashi, P. S., Zhang, L., 2002. The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo. *J Exp Med*. **196**: (2): 261-7.

Fournel, C., Chabanne, L., Caux, C., Faure, J. R., Rigal, D., Magnol, J. P., Monier, J. C., 1992. Canine systemic lupus erythematosus. I: A study of 75 cases. *Lupus*. **1**: (3): 133-9.

Fowell, D. J., Bix, M., Shinkai, K., Lacy, D., Locksley, R. M., 1998. Disease susceptibility and development of the cytokine repertoire in the murine *Leishmania major* model. *Eur Cytokine Netw*. **9**: (3 Suppl): 102-6.

Fowler, D. H., Kurasawa, K., Husebekk, A., Cohen, P. A., Gress, R. E., 1994. Cells of Th2 cytokine phenotype prevent LPS-induced lethality during murine graft-versus-host reaction. Regulation of cytokines and CD8+ lymphoid engraftment. *J Immunol*. **152**: (3): 1004-13.

Gadina, M., Ferguson, P. R., Johnston, J. A., 2003. New interleukins: are there any more? *Curr Opin Infect Dis*. **16**: (3): 211-7.

- Gately, M. K., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Chizzonite, R., 1992. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol.* **143**: (1): 127-42.
- Gately, M. K. and Brunda, M. J., 1995. Interleukin-12: a pivotal regulator of cell-mediated immunity. *Cancer Treat Res.* **80**: 341-66.
- Gately, M. K. and Mulqueen, M. J., 1996. Interleukin-12: potential clinical applications in the treatment and prevention of infectious diseases. *Drugs.* **52 Suppl 2**: 18-25; discussion 25-6.
- Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U., Presky, D. H., 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* **16**: 495-521.
- Gelpi, C., Rodriguez-Sanchez, J. L., Martinez, M. A., Craft, J., Hardin, J. A., 1988. Murine graft vs host disease. A model for study of mechanisms that generate autoantibodies to ribonucleoproteins. *J Immunol.* **140**: (12): 4160-6.
- Gelpi, C., Martinez, M. A., Vidal, S., Alguero, A., Juarez, C., Hardin, J. A., Rodriguez-Sanchez, J. L., 1990. Different strains of donor parental lymphoid cells induce different models of chronic graft-versus-host disease in murine (Balb/c x A/J)F1 hybrid hosts. *Clin Immunol Immunopathol.* **56**: (3): 298-310.
- Gelpi, C., Martinez, M. A., Vidal, S., Targoff, I. N., Rodriguez-Sanchez, J. L., 1994. Autoantibodies to a transfer RNA-associated protein in a murine model of chronic graft versus host disease. *J Immunol.* **152**: (4): 1989-99.
- Germann, T. and Rude, E., 1995. Interleukin-12. *Int Arch Allergy Immunol.* **108**: (2): 103-12.
- Gleichmann, E., Van Elven, E. H., Van der Veen, J. P., 1982. A systemic lupus erythematosus (SLE)-like disease in mice induced by abnormal T-B cell cooperation. Preferential formation of autoantibodies characteristic of SLE. *Eur J Immunol.* **12**: (2): 152-9.

Gleichmann, H. and Gleichmann, E., 1984. GVHD, a model for Spanish toxic oil syndrome? *Lancet*. **1**: (8392): 1474.

Glimcher, L. H. and Murphy, K. M., 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. **14**: (14): 1693-711.

Gomez, D., Correa, P. A., Gomez, L. M., Cadena, J., Molina, J. F., Anaya, J. M., 2004. Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective? *Semin Arthritis Rheum*. **33**: (6): 404-13.

Gracie, J. A., Forsey, R. J., Chan, W. L., Gilmour, A., Leung, B. P., Greer, M. R., Kennedy, K., Carter, R., Wei, X. Q., Xu, D., Field, M., Foulis, A., Liew, F. Y., McInnes, I. B., 1999. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. **104**: (10): 1393-401.

Gregersen, P. K., Goyert, S. M., Song, Q. L., Silver, J., 1987. Microheterogeneity of HLA-DR4 haplotypes: DNA sequence analysis of LD"KT2" and LD"TAS" haplotypes. *Hum Immunol*. **19**: (4): 287-92.

Grewal, I. S., Foellmer, H. G., Grewal, K. D., Xu, J., Hardardottir, F., Baron, J. L., Janeway, C. A., Jr., Flavell, R. A., 1996. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science*. **273**: (5283): 1864-7.

Grogan, J. L., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D. A., Sedat, J. W., Locksley, R. M., 2001. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*. **14**: (3): 205-15.

Haakenstad, A. O. and Mannik, M., 1974. Saturation of the reticuloendothelial system with soluble immune complexes. *J Immunol*. **112**: (5): 1939-48.

Hakim, F. T., Sharrow, S. O., Payne, S., Shearer, G. M., 1991. Repopulation of host lymphohematopoietic systems by donor cells during graft-versus-host reaction in unirradiated adult F1 mice injected with parental lymphocytes. *J Immunol*. **146**: (7): 2108-15.

Hall, F. C., Brown, M. A., Weeks, D. E., Walsh, S., Nicod, A., Butcher, S.,

Andrews, L. J. Wordsworth, B. P., 1997. A linkage study across the T cell receptor A and T cell receptor B loci in families with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **40**: (10): 1798-802.

Hasegawa, M., Fujimoto, M., Kikuchi, K. Takehara, K., 1997. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* **24**: (2): 328-32.

Heldt, C., Listing, J., Sozeri, O., Blasing, F., Frischbutter, S. Muller, B., 2003. Differential expression of HLA class II genes associated with disease susceptibility and progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**: (10): 2779-87.

Hill, J. A., Wang, D., Jevnikar, A. M., Cairns, E. Bell, D. A., 2003. The relationship between predicted peptide-MHC class II affinity and T-cell activation in a HLA-DRbeta1*0401 transgenic mouse model. *Arthritis Res Ther.* **5**: (1): R40-8.

Hirayama, F., Katayama, N., Neben, S., Donaldson, D., Nickbarg, E. B., Clark, S. C. Ogawa, M., 1994. Synergistic interaction between interleukin-12 and steel factor in support of proliferation of murine lymphohematopoietic progenitors in culture. *Blood.* **83**: (1): 92-8.

Hollo, K., Glant, T. T., Garzo, M., Finnegan, A., Mikecz, K. Buzas, E., 2000. Complex pattern of Th1 and Th2 activation with a preferential increase of autoreactive Th1 cells in BALB/c mice with proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* **120**: (1): 167-73.

Holmdahl, R., Goldschmidt, T. J., Kleinau, S., Kvick, C. Jonsson, R., 1992. Arthritis induced in rats with adjuvant oil is a genetically restricted, alpha beta T-cell dependent autoimmune disease. *Immunology.* **76**: (2): 197-202.

Hosken, N. A., Shibuya, K., Heath, A. W., Murphy, K. M. O'Garra, A., 1995. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med.* **182**: (5): 1579-84.

Houssiau, F. A., Mascart-Lemone, F., Stevens, M., Libin, M., Devogelaer, J. P., Goldman, M. Renauld, J. C., 1997. IL-12 inhibits in vitro immunoglobulin

production by human lupus peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Clin Exp Immunol.* **108**: (2): 375-80.

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., O'Garra, A., Murphy, K. M., 1995. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med.* **181**: (2): 713-21.

Huang, S. K., Xiao, H. Q., Kleine-Tebbe, J., Paciotti, G., Marsh, D. G., Lichtenstein, L. M., Liu, M. C., 1995. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol.* **155**: (5): 2688-94.

Isomaki, P., Luukkainen, R., Lassila, O., Toivanen, P., Punnonen, J., 1999. Synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis are refractory to the T helper type 2 differentiation-inducing effects of interleukin-4. *Immunology.* **96**: (3): 358-64.

Izui, S. and Eisenberg, R. A., 1980. Circulating anti-DNA-rheumatoid factor complexes in MRL/1 mice. *Clin Immunol Immunopathol.* **15**: (3): 536-51.

Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Guler, M. L., Gorham, J. D., Murphy, K. M., 1995. Regulation of interleukin-12 signal transduction during T helper phenotype development. *Res Immunol.* **146**: (7-8): 446-56.

Jerne, N. K., 1974. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris).* **125C**: (1-2): 373-89.

Jirholt, J., Lindqvist, A. B., Holmdahl, R., 2001. The genetics of rheumatoid arthritis and the need for animal models to find and understand the underlying genes. *Arthritis Res.* **3**: (2): 87-97.

Joosten, L. A., Lubberts, E., Helsen, M. M., Saxne, T., Coenen-de Roo, C. J., Heinegard, D., van den Berg, W. B., 1999. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res.* **1**: (1): 81-91.

Kamogawa, Y., Minasi, L. A., Carding, S. R., Bottomly, K., Flavell, R. A., 1993. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell.* **75**: (5): 985-95.

- Kang, K., Kubin, M., Cooper, K. D., Lessin, S. R., Trinchieri, G., Rook, A. H., 1996. IL-12 synthesis by human Langerhans cells. *J Immunol.* **156**: (4): 1402-7.
- Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., Grusby, M. J., 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature.* **382**: (6587): 174-7.
- Kasama, T., Yamazaki, J., Hanaoka, R., Miwa, Y., Hatano, Y., Kobayashi, K., Negishi, M., Ide, H., Adachi, M., 1999. Biphasic regulation of the development of murine type II collagen-induced arthritis by interleukin-12: possible involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* **42**: (1): 100-9.
- Kataoka, Y., Iwasaki, T., Kuroiwa, T., Seto, Y., Iwata, N., Hashimoto, N., Ogata, A., Hamano, T., Kakishita, E., 2001. The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease. *Immunology.* **103**: (3): 310-8.
- Kawasaki, Y., Suzuki, J., Sakai, N., Isome, M., Nozawa, R., Tanji, M., Suzuki, H., 2004. Evaluation of T helper-1/-2 balance on the basis of IgG subclasses and serum cytokines in children with glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* **44**: (1): 42-9.
- Kennedy, M. K., Picha, K. S., Fanslow, W. C., Grabstein, K. H., Alderson, M. R., Clifford, K. N., Chin, W. A., Mohler, K. M., 1996. CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur J Immunol.* **26**: (2): 370-8.
- Kessler, S. W., 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol.* **115**: (6): 1617-24.
- Khoruts, A., Miller, S. D., Jenkins, M. K., 1995. Neuroantigen-specific Th2 cells are inefficient suppressors of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by effector Th1 cells. *J Immunol.* **155**: (10): 5011-7.

Kim, W., Min, S., Cho, M., Youn, J., Min, J., Lee, S., Park, S., Cho, C., Kim, H., Kim, W. U., Min, S. Y., Cho, M. L., Min, D. J., Lee, S. H., Park, S. H., Cho, C. S. Kim, H. Y., 2000. The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* **119**: (1): 175-81.

Kimberly, R. P., Meryhew, N. L. Runquist, O. A., 1987. Mononuclear phagocyte system complement receptor dysfunction in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* **138**: (12): 4165-8.

Klareskog, L., Lorentzen, J., Padyukov, L. Alfredsson, L., 2002. Genes and environment in arthritis: can RA be prevented? *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**: S31-6.

Klein, L. and Kyewski, B., 2000. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med.* **78**: (9): 483-94.

Krenger, W., Rossi, S., Piali, L. Hollander, G. A., 2000. Thymic atrophy in murine acute graft-versus-host disease is effected by impaired cell cycle progression of host pro-T and pre-T cells. *Blood.* **96**: (1): 347-54.

Kuchroo, V. K., Anderson, A. C., Waldner, H., Munder, M., Bettelli, E. Nicholson, L. B., 2002. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol.* **20**: 101-23.

Lafaille, J. J., Keere, F. V., Hsu, A. L., Baron, J. L., Haas, W., Raine, C. S. Tonegawa, S., 1997. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med.* **186**: (2): 307-12.

Lefkowitz, J. B., Kiehl, M., Rubenstein, J., DiValerio, R., Bernstein, K., Kahl, L., Rubin, R. L. Gourley, M., 1996. Heterogeneity and clinical significance of glomerular-binding antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* **98**: (6): 1373-80.

Lerner, M. R. and Steitz, J. A., 1979. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus

erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**: (11): 5495-9.

Levings, M. K., Sangregorio, R., Roncarolo, M. G., 2001. Human cd25(+)cd4(+) γ regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*. **193**: (11): 1295-302.

Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E., Moser, B., 1998. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol*. **28**: (11): 3696-705.

Ma, X., D'Andrea, A., Kubin, M., Aste-Amezaga, M., Sartori, A., Monteiro, J., Showe, L., Wysocka, M., Trinchieri, G., 1995. Production of interleukin-12. *Res Immunol*. **146**: (7-8): 432-8.

Mageed, R. A., Borretzen, M., Moyes, S. P., Thompson, K. M., Natvig, J. B., 1997. Rheumatoid factor autoantibodies in health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. **815**: 296-311.

Manns, M. P. and Obermayer-Straub, P., 1997. Cytochromes P450 and uridine triphosphate-glucuronosyltransferases: model autoantigens to study drug-induced, virus-induced, and autoimmune liver disease. *Hepatology*. **26**: (4): 1054-66.

Marshall, J. D., Secrist, H., DeKruyff, R. H., Wolf, S. F., Umetsu, D. T., 1995. IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol*. **155**: (1): 111-7.

Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., Mathis, D., 1999. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*. **286**: (5445): 1732-5.

Matsumoto, K., Yoshikai, Y., Asano, T., Himeno, K., Iwasaki, A., Nomoto, K., 1991. Defect in negative selection in lpr donor-derived T cells differentiating in non-lpr host thymus. *J Exp Med*. **173**: (1): 127-36.

McChesney, M. B., Miller, C. J., Rota, P. A., Zhu, Y. D., Antipa, L., Lerche, N. W., Ahmed, R., Bellini, W. J., 1997. Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology*. **233**: (1): 74-84.

- McDermott, M., Kastner, D. L., Holloman, J. D., Schmidt-Wolf, G., Lundberg, A. S., Sinha, A. A., Hsu, C., Cashin, P., Molloy, M. G., Mulcahy, B., 1995. The role of T cell receptor beta chain genes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**: (1): 91-5.
- McDevitt, H., 2000. A new model for rheumatoid arthritis? *Arthritis Res.* **2**: (2): 85-9.
- McKnight, A. J., Zimmer, G. J., Fogelman, I., Wolf, S. F., Abbas, A. K., 1994. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J Immunol.* **152**: (5): 2172-9.
- Merberg, D. M., Wolf, S. F., Clark, S. C., 1992. Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunol Today.* **13**: (2): 77-8.
- Metzger, D. W., McNutt, R. M., Collins, J. T., Buchanan, J. M., Van Cleave, V. H., Dunnick, W. A., 1997. Interleukin-12 acts as an adjuvant for humoral immunity through interferon-gamma-dependent and -independent mechanisms. *Eur J Immunol.* **27**: (8): 1958-65.
- Miller, C. L. and Lim, R. C., 1986. Post-ischemia immunosuppression in a miniature swine model. *Lab Anim Sci.* **36**: (4): 375-80.
- Miller, J. F., 2001. Immune self-tolerance mechanisms. *Transplantation.* **72**: (8 Suppl): S5-9.
- Miossec, P., Chomarat, P., Dechanet, J., 1996. Bypassing the antigen to control rheumatoid arthritis. *Immunol Today.* **17**: (4): 170-3.
- Mohan, C. and Datta, S. K., 1995. Lupus: key pathogenic mechanisms and contributing factors. *Clin Immunol Immunopathol.* **77**: (3): 209-20.
- Mok, C. C. and Lau, C. S., 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* **56**: (7): 481-90.
- Moser, H., Liechti-Gallati, S., Braga, S., Hirsiger, H., 1987. [Carrier diagnosis and prenatal prognosis using DNA analysis in X-chromosome-linked Duchenne and Becker muscular dystrophy]. *Schweiz Med Wochenschr.* **117**:

(51): 2061-73.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* **7**: 145-73.

Mueller, R., Krahl, T., Sarvetnick, N., 1996. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med.* **184**: (3): 1093-9.

Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., Reiner, S. L., 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science.* **292**: (5523): 1907-10.

Murphy, W. J., Welniak, L. A., Taub, D. D., Wiltrot, R. H., Taylor, P. A., Vallera, D. A., Kopf, M., Young, H., Longo, D. L., Blazar, B. R., 1998. Differential effects of the absence of interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Clin Invest.* **102**: (9): 1742-8.

Murphy, W. J., 2000. Revisiting graft-versus-host disease models of autoimmunity: new insights in immune regulatory processes. *J Clin Invest.* **106**: (6): 745-7.

Murray, J. S., Pfeiffer, C., Madri, J., Bottomly, K., 1992. Major histocompatibility complex (MHC) control of CD4 T cell subset activation. II. A single peptide induces either humoral or cell-mediated responses in mice of distinct MHC genotype. *Eur J Immunol.* **22**: (2): 559-65.

Nakajima, A., Seroogy, C. M., Sandora, M. R., Tarner, I. H., Costa, G. L., Taylor-Edwards, C., Bachmann, M. H., Contag, C. H., Fathman, C. G., 2001. Antigen-specific T cell-mediated gene therapy in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest.* **107**: (10): 1293-301.

Neu, E., Hemmerich, P. H., Peter, H. H., Krawinkel, U., von Mikecz, A. H., 1997. Characteristic epitope recognition pattern of autoantibodies against eukaryotic ribosomal protein L7 in systemic autoimmune diseases. *Arthritis*

Rheum. **40**: (4): 661-71.

Nguyen, K. B., Watford, W. T., Salomon, R., Hofmann, S. R., Pien, G. C., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J. J., Biron, C. A., 2002. Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science*. **297**: (5589): 2063-6.

Nobrega, A., Stransky, B., Nicolas, N., Coutinho, A., 2002. Regeneration of natural antibody repertoire after massive ablation of lymphoid system: robust selection mechanisms preserve antigen binding specificities. *J Immunol*. **169**: (6): 2971-8.

O'Dell, J. R. and Kotzin, B. L., 1985. In vitro production of anti-histone antibodies by spleen cells from young autoantibody negative NZB/NZW mice. *J Immunol*. **135**: (2): 1101-7.

O'Garra, A. and Murphy, K., 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol*. **6**: (3): 458-66.

O'Hara, R. M., Jr., Henderson, S. L., Nagelin, A., 1996. Prevention of a Th1 disease by a Th1 cytokine: IL-12 and diabetes in NOD mice. *Ann N Y Acad Sci*. **795**: 241-9.

O'Shea, J. J., Gadina, M., Schreiber, R. D., 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. **109** Suppl: S121-31.

Okubo, T., Hagiwara, E., Ohno, S., Tsuji, T., Ihata, A., Ueda, A., Shirai, A., Aoki, I., Okuda, K., Miyazaki, J., Ishigatsubo, Y., 1999. Administration of an IL-12-encoding DNA plasmid prevents the development of chronic graft-versus-host disease (GVHD). *J Immunol*. **162**: (7): 4013-7.

Oriente, A., Fedarko, N. S., Pacocha, S. E., Huang, S. K., Lichtenstein, L. M., Essayan, D. M., 2000. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*. **292**: (3): 988-94.

Pals, S. T., Radaszkiewicz, T., Roozendaal, L., Gleichmann, E., 1985. Chronic progressive polyarthritis and other symptoms of collagen vascular disease induced by graft-vs-host reaction. *J Immunol*. **134**: (3): 1475-82.

Parks, E., Strieter, R. M., Lukacs, N. W., Gauldie, J., Hitt, M., Graham, F. L., Kunkel, S. L., 1998. Transient gene transfer of IL-12 regulates chemokine expression and disease severity in experimental arthritis. *J Immunol.* **160**: (9): 4615-9.

Paul, W. E. and Seder, R. A., 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* **76**: (2): 241-51.

Perussia, B., Chan, S. H., D'Andrea, A., Tsuji, K., Santoli, D., Pospisil, M., Young, D., Wolf, S. F., Trinchieri, G., 1992. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *J Immunol.* **149**: (11): 3495-502.

Pisetsky, D. S., Grudier, J. P., Gilkeson, G. S., 1990. A role for immunogenic DNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **33**: (2): 153-9.

Prud'homme, G. J., Kono, D. H., Theofilopoulos, A. N., 1995. Quantitative polymerase chain reaction analysis reveals marked overexpression of interleukin-1 beta, interleukin-1 and interferon-gamma mRNA in the lymph nodes of lupus-prone mice. *Mol Immunol.* **32**: (7): 495-503.

Puck, J. M. and Sneller, M. C., 1997. ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol.* **9**: (1): 77-84.

Ravetch, J. V. and Clynes, R. A., 1998. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol.* **16**: 421-32.

Rempel, J. D., Wang, M., HayGlass, K. T., 1997. In vivo IL-12 administration induces profound but transient commitment to T helper cell type 1-associated patterns of cytokine and antibody production. *J Immunol.* **159**: (3): 1490-6.

Rennick, D. M., Fort, M. M., Davidson, N. J., 1997. Studies with IL-10-/- mice: an overview. *J Leukoc Biol.* **61**: (4): 389-96.

Reveille, J. D., Ball, E. J., Khan, M. A., 2001. HLA-B27 and genetic

predisposing factors in spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol.* **13**: (4): 265-72.

Riise, T., Jacobsen, B. K.Gran, J. T., 2000. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in the county of Troms, northern Norway. *J Rheumatol.* **27**: (6): 1386-9.

Rolink, A. G., Radaszkiewicz, T., Pals, S. T., van der Meer, W. G.Gleichmann, E., 1982. Allosuppressor and allohelper T cells in acute and chronic graft-vs-host disease. I. Alloreactive suppressor cells rather than killer T cells appear to be the decisive effector cells in lethal graft-vs.-host disease. *J Exp Med.* **155**: (5): 1501-22.

Rolink, A. G., Van der Meer, W., Melief, C. J.Gleichmann, E., 1983. Intra-H-2 and T cell requirements for the induction of maximal positive and negative allogeneic effects in vitro. *Eur J Immunol.* **13**: (3): 191-7.

Romagnani, S., 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol.* **12**: 227-57.

Romagnani, S., 1995. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol.* **15**: (3): 121-9.

Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S.Levings, M. K., 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* **182**: 68-79.

Rose, N. R., 2001. Infection, mimics, and autoimmune disease. *J Clin Invest.* **107**: (8): 943-4.

Rothfield, N. F., 1967. Clinical significance of antinuclear antibodies. *J Med Assoc Ga.* **56**: (12): 491-4.

Rothfield, N. F. and Stollar, B. D., 1967. The relation of immunoglobulin class, pattern of anti-nuclear antibody, and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* **46**: (11): 1785-94.

Roths, J. B., Murphy, E. D.Eicher, E. M., 1984. A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp*

Med. **159**: (1): 1-20.

Rozendaal, L., Pals, S. T., Schilham, M., Melief, C. J. Gleichmann, E., 1989. Allosuppression of B cells in vitro by graft-vs.-host reaction-derived T cells is caused by cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* **19**: (9): 1669-75.

Rus, V., Svetic, A., Nguyen, P., Gause, W. C. Via, C. S., 1995. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J Immunol.* **155**: (5): 2396-406.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* **155**: (3): 1151-64.

Sakane, T., Steinberg, A. D., Arnett, F. C., Reinertsen, J. L. Green, I., 1979. Studies of immune functions of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **22**: (7): 770-6.

Sakurai, J., Ohata, J., Saito, K., Miyajima, H., Hirano, T., Kohsaka, T., Enomoto, S., Okumura, K. Azuma, M., 2000. Blockade of CTLA-4 signals inhibits Th2-mediated murine chronic graft-versus-host disease by an enhanced expansion of regulatory CD8+ T cells. *J Immunol.* **164**: (2): 664-9.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R. Lanzavecchia, A., 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* **187**: (6): 875-83.

Salmon, J. E., Edberg, J. C., Brogle, N. L. Kimberly, R. P., 1992. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest.* **89**: (4): 1274-81.

Sambrook, J. and Gething, M. J., 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* **342**: (6247): 224-5.

Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T. S. Chen, Y., 1998. IL-6-

deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol.* **161**: (12): 6480-6.

Saoudi, A., Simmonds, S., Huitinga, I., Mason, D., 1995. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. *J Exp Med.* **182**: (2): 335-44.

Saoudi, A., Seddon, B., Heath, V., Fowell, D., Mason, D., 1996. The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: the function of the thymus in the generation of the regulatory T cell subset. *Immunol Rev.* **149**: 195-216.

Schaller, M., Burton, D. R., Ditzel, H. J., 2001. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol.* **2**: (8): 746-53.

Schifferli, J. A., Ng, Y. C., Peters, D. K., 1986. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med.* **315**: (8): 488-95.

Schmitt, E., Hoehn, P., Germann, T., Rude, E., 1994. Differential effects of interleukin-12 on the development of naive mouse CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol.* **24**: (2): 343-7.

Schmitt, E., Rude, E., Germann, T., 1997. The immunostimulatory function of IL-12 in T-helper cell development and its regulation by TGF-beta, IFN-gamma and IL-4. *Chem Immunol.* **68**: 70-85.

Schorlemmer, H. U., Dickneite, G., Kanzy, E., J. Enssle, K. H., 1995. Modulation of the immunoglobulin dysregulation in GvH- and SLE-like diseases by the murine IL-4 receptor (IL-4-R). *Inflamm Res.* **44 Suppl 2**: S194-6.

Schwartz, A., Tesch, G., Kinoshita, K., Maron, R., Weiner, H. L., Kelley, V. R., 1999. IL-12 drives IFN-gamma-dependent autoimmune kidney disease in

MRL-Fas(lpr) mice. *J Immunol.* **163**: (12): 6884-91.

Scott, B., Kaye, J.Lo, D., 1994. T cells and suppression in vitro. *Science.* **266**: (5184): 464-5.

Seddon, B., 2000. The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: generation, specificity and mode of action. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* **48**: (5): 339-45.

Seder, R. A. and Paul, W. E., 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol.* **12**: 635-73.

Seder, R. A., Kelsall, B. L.Jankovic, D., 1996. Differential roles for IL-12 in the maintenance of immune responses in infectious versus autoimmune disease. *J Immunol.* **157**: (7): 2745-8.

Segal, R., Bermas, B. L., Dayan, M., Kalush, F., Shearer, G. M.Mozes, E., 1997. Kinetics of cytokine production in experimental systemic lupus erythematosus: involvement of T helper cell 1/T helper cell 2-type cytokines in disease. *J Immunol.* **158**: (6): 3009-16.

Segal, R., Dayan, M., Zinger, H., Habut, B., Shearer, G. M.Mozes, E., 2003. The effect of IL-12 on clinical and laboratory aspects of experimental SLE in young and aging mice. *Exp Gerontol.* **38**: (6): 661-8.

Shearer, G. M. and Polisson, R. P., 1980. Mutual recognition of parental and F1 lymphocytes. Selective abrogation of cytotoxic potential of F1 lymphocytes by parental lymphocytes. *J Exp Med.* **151**: (1): 20-31.

Shevach, E. M., 2000. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol.* **18**: 423-49.

Shores, E. W., Eisenberg, R. A.Cohen, P. L., 1986. Role of the Sm antigen in the generation of anti-Sm autoantibodies in the SLE-prone MRL mouse. *J Immunol.* **136**: (10): 3662-7.

Silman, A. J. and Pearson, J. E., 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**: S265-72.

Smale, S. T. and Fisher, A. G., 2002. Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu Rev Immunol.* **20**: 427-62.

Sprent, J., Schaefer, M., Korngold, R., 1990. Role of T cell subsets in lethal graft-versus-host disease (GVHD) directed to class I versus class II H-2 differences. II. Protective effects of L3T4+ cells in anti-class II GVHD. *J Immunol.* **144**: (8): 2946-54.

Susan, P. P. and Dunn, W. A., Jr., 2001. Starvation-induced lysosomal degradation of aldolase B requires glutamine 111 in a signal sequence for chaperone-mediated transport. *J Cell Physiol.* **187**: (1): 48-58.

Suzuki, N., Harada, T., Mizushima, Y., Sakane, T., 1993. Possible pathogenic role of cationic anti-DNA autoantibodies in the development of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* **151**: (2): 1128-36.

Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M., 1990. CD4+ T cell subsets. Lymphokine secretion of memory cells and of effector cells that develop from precursors in vitro. *J Immunol.* **144**: (5): 1788-99.

Swain, S. L., 1999. Helper T cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* **11**: (2): 180-5.

Sweeney, S. E. and Firestein, G. S., 2004a. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**: (3): 372-8.

Sweeney, S. E. and Firestein, G. S., 2004b. Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* **16**: (3): 231-7.

Swihart, K., Fruth, U., Messmer, N., Hug, K., Behin, R., Huang, S., Del Giudice, G., Aguet, M., Louis, J. A., 1995. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J Exp Med.* **181**: (3): 961-71.

Sykes, M., Szot, G. L., Nguyen, P. L., Pearson, D. A., 1995. Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease. *Blood.* **86**: (6): 2429-38.

Sykes, M., Pearson, D. A., Taylor, P. A., Szot, G. L., Goldman, S. J., Blazar, B.

- R., 1999. Dose and timing of interleukin (IL)-12 and timing and type of total-body irradiation: effects on graft-vs.-host disease inhibition and toxicity of exogenous IL-12 in murine bone marrow transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* **5**: (5): 277-84.
- Szabo, S. J., Glimcher, L. H., Ho, I. C., 1997. Genes that regulate interleukin-4 expression in T cells. *Curr Opin Immunol.* **9**: (6): 776-81.
- Szebeni, J., Wang, M. G., Pearson, D. A., Szot, G. L., Sykes, M., 1994. IL-2 inhibits early increases in serum gamma interferon levels associated with graft-versus-host-disease. *Transplantation.* **58**: (12): 1385-93.
- Takagi, T., Tsao, P. W., Totsuka, R., Suzuki, T., Murata, T., Takata, I., 1998. Dexamethasone prevents the decrease of bone mineral density in type II collagen-induced rat arthritis model. *Jpn J Pharmacol.* **78**: (2): 225-8.
- Takahashi, S., Fossati, L., Iwamoto, M., Merino, R., Motta, R., Kobayakawa, T., Izui, S., 1996. Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J Clin Invest.* **97**: (7): 1597-604.
- Takei, F., 1984. Unique surface phenotype of T cells in lymphoproliferative autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Immunol.* **133**: (4): 1951-4.
- Takenaka, H., Maruo, S., Yamamoto, N., Wysocka, M., Ono, S., Kobayashi, M., Yagita, H., Okumura, K., Hamaoka, T., Trinchieri, G., Fujiwara, H., 1997. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J Leukoc Biol.* **61**: (1): 80-7.
- Tokano, Y., Morimoto, S., Kaneko, H., Amano, H., Nozawa, K., Takasaki, Y., Hashimoto, H., 1999. Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)--relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clin Exp Immunol.* **116**: (1): 169-73.
- Tomura, M., Zhou, X. Y., Maruo, S., Ahn, H. J., Hamaoka, T., Okumura, H., Nakanishi, K., Tanimoto, T., Kurimoto, M., Fujiwara, H., 1998. A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells. *J*

Immunol. **160**: (10): 4738-46.

Trentham, D. E., Townes, A. S., Kang, A. H., 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med.* **146**: (3): 857-68.

Trinchieri, G., 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* **13**: 251-76.

Trinchieri, G. and Scott, P., 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. *Res Immunol.* **146**: (7-8): 423-31.

Tripp, C. S., Wolf, S. F., Unanue, E. R., 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: (8): 3725-9.

Tsai, C. Y., Wu, T. H., Huang, S. F., Sun, K. H., Hsieh, S. C., Han, S. H., Yu, H. S., Yu, C. L., 1995. Abnormal splenic and thymic IL-4 and TNF-alpha expression in MRL-lpr/lpr mice. *Scand J Immunol.* **41**: (2): 157-63.

Tschetter, J. R., Mozes, E., Shearer, G. M., 2000. Progression from acute to chronic disease in a murine parent-into-F1 model of graft-versus-host disease. *J Immunol.* **165**: (10): 5987-94.

Umland, S. P., Razac, S., Nahrebne, D. K., Seymour, B. W., 1992. Effects of in vivo administration of interferon (IFN)-gamma, anti-IFN-gamma, or anti-interleukin-4 monoclonal antibodies in chronic autoimmune graft-versus-host disease. *Clin Immunol Immunopathol.* **63**: (1): 66-73.

Union, A., Meheus, L., Humbel, R. L., Conrad, K., Steiner, G., Moereels, H., Pottel, H., Serre, G., De Keyser, F., 2002. Identification of citrullinated rheumatoid arthritis-specific epitopes in natural filaggrin relevant for antifilaggrin autoantibody detection by line immunoassay. *Arthritis Rheum.* **46**: (5): 1185-95.

van den Berg, W. B., 1998. Joint inflammation and cartilage destruction may

occur uncoupled. *Springer Semin Immunopathol.* **20**: (1-2): 149-64.

van Eden, W., Thole, J. E., van der Zee, R., Noordzij, A., van Embden, J. D., Hensen, E. J. Cohen, I. R., 1988. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature.* **331**: (6152): 171-3.

van Rappard-van der Veen, F. M., Rolink, A. G. Gleichmann, E., 1982. Diseases caused by reactions of T lymphocytes towards incompatible structures of the major histocompatibility complex. VI. Autoantibodies characteristic of systemic lupus erythematosus induced by abnormal T-B cell cooperation across I-E. *J Exp Med.* **155**: (5): 1555-60.

Via, C. S., Sharrow, S. O. Shearer, G. M., 1987. Role of cytotoxic T lymphocytes in the prevention of lupus-like disease occurring in a murine model of graft-vs-host disease. *J Immunol.* **139**: (6): 1840-9.

Via, C. S. and Finkelman, F. D., 1993. Critical role of interleukin-2 in the development of acute graft-versus-host disease. *Int Immunol.* **5**: (6): 565-72.

Via, C. S., Rus, V., Gately, M. K. Finkelman, F. D., 1994. IL-12 stimulates the development of acute graft-versus-host disease in mice that normally would develop chronic, autoimmune graft-versus-host disease. *J Immunol.* **153**: (9): 4040-7.

Vidal, S., Labrador, M., Rodriguez-Sanchez, J. L. Gelpi, C., 1996. The role of BALB/c donor CD8+ lymphocytes in graft-versus-host disease in (BALB/c x A/J)F1 (CAF1) mice. *J Immunol.* **156**: (3): 997-1005.

Vingsbo, C., Sahlstrand, P., Brun, J. G., Jonsson, R., Saxne, T. Holmdahl, R., 1996. Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. *Am J Pathol.* **149**: (5): 1675-83.

Walport, M. J. and Lachmann, P. J., 1990. Complement deficiencies and abnormalities of the complement system in systemic lupus erythematosus

and related disorders. *Curr Opin Rheumatol.* **2**: (4): 661-3.

Wang, L., Hertzog, P. J., Galanis, M., Overall, M. L., Waine, G. J., Linnane, A. W., 1994. Structure-function analysis of human IFN- α . Mapping of a conformational epitope by homologue scanning. *J Immunol.* **152**: (2): 705-15.

Watanabe, D., Suda, T., Hashimoto, H., Nagata, S., 1995. Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. *Embo J.* **14**: (1): 12-8.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nagata, S., 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* **356**: (6367): 314-7.

Watford, W. T., Moriguchi, M., Morinobu, A., O'Shea, J. J., 2003. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**: (5): 361-8.

Wedderburn, L. R., Robinson, N., Patel, A., Varsani, H., Woo, P., 2000. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**: (4): 765-74.

Wener, M. H., Mannik, M., Schwartz, M. M., Lewis, E. J., 1987. Relationship between renal pathology and the size of circulating immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore).* **66**: (2): 85-97.

Wenner, C. A., Guler, M. L., Macatonia, S. E., O'Garra, A., Murphy, K. M., 1996. Roles of IFN- γ and IFN- α in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol.* **156**: (4): 1442-7.

Williamson, E., Garside, P., Bradley, J. A., Mowat, A. M., 1996. IL-12 is a central mediator of acute graft-versus-host disease in mice. *J Immunol.* **157**: (2): 689-99.

Winchester, R., 1994. The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Adv Immunol.* **56**: 389-466.

- Winfield, J. B., 1997. Are anti-ribosomal P protein antibodies a type of anti-lymphocyte antibody? *Clin Exp Immunol.* **109**: (1): 1-3.
- Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R. M. et al., 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol.* **146**: (9): 3074-81.
- Wraith, D. C., Goldman, M., Lambert, P. H., 2003. Vaccination and autoimmune disease: what is the evidence? *Lancet.* **362**: (9396): 1659-66.
- Wu, J., Wilson, J., He, J., Xiang, L., Schur, P. H., Mountz, J. D., 1996. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest.* **98**: (5): 1107-13.
- Wynn, T. A., Jankovic, D., Hieny, S., Zioncheck, K., Jardieu, P., Cheever, A. W., Sher, A., 1995. IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN-gamma. *J Immunol.* **154**: (8): 3999-4009.
- Yanase, K., Smith, R. M., Puccetti, A., Jarett, L., Madaio, M. P., 1997. Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1. *J Clin Invest.* **100**: (1): 25-31.
- Yang, Y. G., Dey, B., Sergio, J. J., Sykes, M., 1997. Interleukin-12 prevents severe acute graft-versus-host disease (GVHD) and GVHD-associated immune dysfunction in a fully major histocompatibility complex haplotype-mismatched murine bone marrow transplantation model. *Transplantation.* **64**: (9): 1343-52.
- Yang, Y. G., Dey, B. R., Sergio, J. J., Pearson, D. A., Sykes, M., 1998. Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J Clin Invest.* **102**: (12): 2126-35.
- Yang, Y. G. and Sykes, M., 1999. The role of interleukin-12 in preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells independently of GVHD. *Leuk Lymphoma.* **33**: (5-6): 409-20.
- Yoo, T. J., Kim, S. Y., Stuart, J. M., Floyd, R. A., Olson, G. A., Cremer, M.

- A.Kang, A. H., 1988. Induction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen. *J Exp Med.* **168**: (2): 777-82.
- Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M. Yoshida, T. O., 1994. IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem Biophys Res Commun.* **198**: (3): 857-61.
- Zanelli, E., Vos, K., Breedveld, F., de Vries, R. David, C., 2000. Role of HLA-DQ in rheumatoid arthritis susceptibility: comment on the article by de Vries et al. *Arthritis Rheum.* **43**: (4): 946-8.
- Zelenika, D., Adams, E., Humm, S., Lin, C. Y., Waldmann, H. Cobbold, S. P., 2001. The role of CD4+ T-cell subsets in determining transplantation rejection or tolerance. *Immunol Rev.* **182**: 164-79.
- Zeng, D., Lan, F., Hoffmann, P. Strober, S., 2004. Suppression of graft-versus-host disease by naturally occurring regulatory T cells. *Transplantation.* **77**: (1 Suppl): S9-S11.
- Zhang, J., Bardos, T., Mikecz, K., Finnegan, A. Glant, T. T., 2001. Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis. *J Immunol.* **166**: (8): 4981-6.
- Zhang, Y. and Gilliam, A. C., 2002. Animal models for scleroderma: an update. *Curr Rheumatol Rep.* **4**: (2): 150-62.
- Ziolkowska, M., Koc, A., Luszczkiewicz, G., Ksiezopolska-Pietrzak, K., Klimczak, E., Chwalinska-Sadowska, H. Maslinski, W., 2000. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol.* **164**: (5): 2832-8.
- Zou, J., Presky, D. H., Wu, C. Y. Gubler, U., 1997. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J Biol Chem.* **272**: (9): 6073-7.

ANEXO

The IL-12 Role in Donor Cell Engraftment in a Murine Model of Semiallogenic GVH Disease with Signs of Autoimmune Disease

FRANCISCA GALLEGO and CARMEN GELPÍ*

Department of Immunology, Hospital de Sant Pau, Avda S. Antoni Ma Claret 167, 08025, Barcelona, Spain

(Submitted 28 July 2003; Accepted with revisions 24 November 2003)

We analyzed the IL-12 effect in an autoimmune disease induced in a semiallogenic murine model of graft-vs-host disease (GVHD) Balb/c semiallogenic lymphoid cells i.v. infected in hybrid mice (Balb/c × A/J) F1 (CAF). IL-12 was administered 1 h before cell transplantation following two different protocols: (a) injecting 2 µg of mrIL-12 (murine recombinant IL-12) per mouse before the first semiallogenic cell injection; or (b) injecting the 2 µg of mrIL-12 fractionated in 5 days. A Th1 response was produced but an acute GVHD did not appear although differences in class I and II major histocompatibility complex (MHC) antigens were present. Four days after the semiallogenic cell transfer, IL-12 treated mice showed a marked reduction in the percent of spleen B cells compared with CAF1 control and CAF1 + Balb/c GVHD mice. After 5–6 months of follow-up, the donor cell chimerism increased significantly in spleen (70 ± 31 vs. $43 \pm 31\%$) and in thymus. Flow cytometry of spleen lymphocytes demonstrated that donor chimerism was made up of TCD4, TCD8 and B lymphocytes and was higher in animals injected with IL-12. Moreover, CD8 T lymphocytes were 100% donor origin in the IL-12-injected group of GVHD animals and 50% origin in the IL-12-non-injected CAF1 + Balb/c group of animals. This paper shows that: (1) IL-12 may play a role in the mechanisms of donor cell engraftment, probably produced by a CTL donor anti-host mechanism; (2) no acute GVHD was induced in spite of class I and II MHC differences; (3) IL-12 did not show any effect on the AR-like clinical signs of disease developed in this model of GVHD although histological subclinical signs were less frequent, and no glomerulonephritis was detected in the IL-12-treated GVHD mice.

Keywords: Major histocompatibility complex (MHC); Glomerulonephritis; IL-12; Arthritis-line; Murine model of graft-vs-host-disease

INTRODUCTION

In a previous paper^[1,2] we described two different models of stimulatory GVHD with autoimmune manifestations induced across differences between the K (class-I) and I-A/I-E (class-II) genetic regions of MHC. Both models were induced in the CAF1 hybrid host (BALB/c × A/J)F1. After injecting BALB/c lymphoid cells, CAF1 mice developed an overlap syndrome of mild SLE and arthritis-like lesions that included swelling of small joints in the hindfeet, associated with a rheumatoid factor.^[2] To investigate the role of CD8 donor cells in the development of the arthritis-like disease, we injected CD8-depleted lymph node and spleen cells to CAF1 mice.^[3] These experiments resulted in high frequency titers and precocity of autoantibodies, including rheumatoid

factors. The animals died of glomerulonephritis before any arthritis lesion appeared. A Th-2 response was responsible for the high and precocious autoantibodies but played no role in the development of the arthritis-like disease.

To analyze the effect of regulating the balance between Th1 and Th2 cells in a background susceptible to produce an arthritis-like disease, we investigated the role of IL-12 treatment on GVH disease development in CAF1 mice injected with Balb/c spleen and lymph node cells. The characteristics of T cell-dependent immune responses were determined, to a large extent, by the cytokines produced during these responses. IL-12 has been shown to play a pivotal role in inducing Th-1 cell-mediated organ-specific autoimmune diseases, as described previously,^[3,4] and a critical role in the regulation of immune responses in various autoimmune disease models.

*Corresponding author. Tel.: +34-93-291-9017. Fax: +34-93-291-9066. E-mail: mgelpi@hsp.santpau.es

The imbalance of cytokines originating from T lymphocytes has been raised as an issue in the pathogenesis of Rheumatoid arthritis (RA). RA is associated with a Th1 immune response, although typical Th1 cytokines, such as IL-2, IFN γ and TNF β have been reported to be scant in synovial fluid or tissues.^[5] Recently, IL-12 was detected in the synovium of RA patients, and macrophage-like cells seem to be the main producers of this cytokine.^[6] In murine type II collagen-induced arthritis, an autoimmune model of RA induced in DBA/1 strain of mice, it was clearly demonstrated that exogenous systemically applied IL-12, either alone or in combination with IL-18, aggravated disease expression by enhancing systemic immunity against type II collagen^[7] probably through activating Th1 lymphocytes.^[7-9] Both the disease promoting and immunostimulatory roles of IL-12 in this RA model were corroborated by studies in IL-12-deficient mice.^[10] Unexpectedly, IL-12 promotes cellular but not humoral type II collagen-specific Th1-type responses in other strains of mice such as C57BL/6 and B10.Q mice, but does not induce arthritis in these strains. The failure to up-regulate a humoral Th-1-response in these strains is specific for collagen II and is not a general property of this strain. Furthermore, it is not the H2b haplotype of C57BL/6 mice or the H2q of the B10.Q, but rather the genetic background (DBA/1 vs. C57BL/6 or B10.Q) that limits the effect of IL-12 on the collagen II-specific antibody response. IL-12 treatment of collagen II-immunized B10.Q mice also failed to induce arthritis and to enhance collagen II-specific IgG2a and IgG2b synthesis.^[11] A part from a role in autoimmune collagen arthritis, Joosten^[12] describes that arthritis induced by local injection of streptococcal cell wall (SCW) fragments was also dependent on IL-12. The authors clearly demonstrated that local overexpression on IL-12 promotes conversion of an acute arthritis to a chronic destructive immune-mediated process which is more susceptible to flares.^[12]

On the other hand, Th1 lymphocytes have been reported to induce a protective response in some experimental animal models of arthritis due to administration of mrIL-12 at high doses (1 μ g/mouse/daily) for 2 or 3 weeks, delaying the onset and reducing the incidence of collagen-induced arthritis. IL-12 has been proposed as a therapy in some autoimmune diseases.^[13] In 2000, Peeva *et al.*,^[14] studied the effect of IL-12 as a pleiotropic cytokine with proinflammatory, immunoregulatory, anti-tumor and antimetastatic properties. Interestingly, in an RA patient being treated with exogenous IL-12 for a metastatic cervical cancer, the drug was shown to cause severe exacerbation of their RA indicating its disease-promoting role.^[15] A number of other RA models can be tools for studying some of these controversial aspects.^[16,17] While large numbers of T lymphocytes accumulated in the inflamed synovium in human rheumatoid arthritis, very few T cells were found in the synovium in collagen-induced arthritis.^[14] We propose the GVHD-mediated arthritis-like model to study this

pathology because it is induced without self-protein immunization and could be closer to the pathogenesis of certain human autoimmune diseases.

Our aim in this study was, firstly, to analyze the induction role of a Th1-response in the development of arthritis, and second, to analyze the mechanisms that protect the host from the induction of an acute GVH disease in a model with mismatches in class I and II MHC antigens.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Female Balb/c (H-2^d) and (Balb/c \times A/J)F1 (CAF1) (H-2^{d/k}) mice were obtained from IffaCredo and Jackson Laboratories (Barr Harbor, ME), respectively. Mice were specified pathogen-free and were maintained under standard animal housing conditions. All mice used in this study were 8–14 weeks-old at the time of cell transfer.

Preparation of Cells for Transfer and Induction of GVH Disease

Graft versus host disease was induced in two groups of 89 and 16 unirradiated CAF1 female mice by means of two i.v. (intravenously) injections of lymphocytes given 5 days apart, as previously described.^[11] The first group of animals was injected with 2×10^7 and 7×10^7 lymphoid cells from Balb/c lymph node and spleen cells, respectively. The second group (16 mice) received CAF1 syngenic lymphoid cells following the same protocol as before.^[11] CAF1 mice injected with Balb/c cells (CAF1+Balb/c) developed a GVHD model as described.^[2] CAF1 mice injected with CAF1 cells (CAF1 + CAF1) were used as syngenic GVHD control, as described.^[2] Moreover, another group of control mice consisted of uninjected age- and sex- matched F1 mice.

In Vivo Treatment of Mice with mrIL-12

A total of 50 GVHD mice were treated with mrIL-12 1 h before the cell transfer: 42 received the semiallogenic stimulus and 8 mice received the syngenic stimulus. Nineteen mice from the semiallogenic group and the 8 animals from the syngenic group received 2 μ g of murine recombinant IL-12 (mrIL-12) (gift from Genetics Institute, Cambridge, Massachusetts) i.p. (intraperitoneally) given in a single dose, 1 h before the first parental cell injection.^[18] Urine and blood samples were obtained at weekly intervals. Animals were sacrificed at 10 days (four of them) and 5–6 months follow-up of the disease. Another 23 animals in the semiallogenic group received 400 ng mrIL-12 i.p. at the time of GVHD induction and at daily intervals thereafter, for a total of five doses (they received a total of 2 μ g of mrIL-12 like the previously mentioned group). These animals were

sacrificed in groups of 5–9 animals at 2d, 4d, 7d and 10 days post-semiallogenic cell transfer.^[19,20] No differences were seen between IL-12 doses varying from 20 to 200 U, or between IL-12 given at 1–60 min before antigen or allogenic cell injection (19 and our not presented data). Differences were seen at high doses of IL-12 or when it was administered after the allogenic cells injection.^[4]

As controls, we studied the syngenic GVHD group of non-treated IL-12 mice and mice mock-treated with PBS. These mice were sacrificed in groups of 2 animals at 2d, 4d and 7d post-semiallogenic cells transfer. Moreover, another group of control mice consisted of 24 uninjected sex- and age-matched F1 mice.

***In Vivo* Treatment of Mice with mrIL-4**

As a Th2-induced control, 6 CAF1 animals received 7 µg of murine recombinant IL4 (RM-IL4-10, Endogen) before the GVHD induction, given i.p. three times a day for a total of 5 days.^[21]

Antibodies

PE-conjugated anti-Thy 1.2, -anti-CD4, -anti-Pan NK, -Streptavidin were purchased from Caltag (Caltag, SO. San Francisco, CA). FITC-conjugated anti-CD8, -anti-CD4, -anti-B220, were purchased from Labgen. PE-anti-H-2K^k, -anti-I-A^k, FITC-anti-H-2K^d, -anti-I-A^d were purchased from Pharmingen (Pharmingen, San Diego, CA). All the reagents used in these analyses gave clearly distinguishable positive peaks of fluorescence intensity. The channel number for distinguishing donor vs host was chosen on the basis of staining of CAF1 (H-2^{k/d}), Balb/c (H-2^d) and A/J (H-2^a) (“a” haplotype is a recombinant of k/d: K^k, I-A/I-E^k, D^d) spleen cells. Other monoclonal antibodies used were 7D4 (anti-IL2 receptor, ATCC) and PK-136 (anti-NK from American Type Culture Collection ATCC HB 191). FITC-anti-IgM was the second antibody used for detected anti-IL-2R and FITC-anti-mouse IgG2a was the second antibody for anti-NK PK-136 (Caltag, SO. San Francisco, CA).

Other monoclonal antibodies used were purified rat anti-mIgE (clone R35-72), Biotin conjugated rat anti-IgE (clone R35-92), purified mIgE standard (clone IgE-3) (Pharmingen, San Diego, CA), goat anti-mouse IgG (M 33000 Caltag), mIgG standard (CONFIRMAR), goat anti-mouse IgG1-HRPO (Caltag M32107), goat anti-mouse IgG2a-HRPO (Caltag M323070), goat anti-mouse IgG2b-HRPO (Caltag M32507), goat anti-mouse IgG3-HRPO (Caltag M32707), rat anti-mouse-IgG-HRPO (Caltag SO. San Francisco, CA).

Clinical and Histological Studies

At weekly intervals, the mice were inspected for signs of runt disease such as diarrhea and ruffled fur. Combur’s test was used to study urine samples for elevated proteinuria. When sacrificed, spleen, thymus, lymph nodes, kidney,

liver and feet were sectioned (fixed and included in paraffin when necessary) and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination. Cryostatic sections were processed for direct immunofluorescence as described.^[22]

Determination of Total IgG, IgG1, IgG2a and IgE

Total IgG, IgG1 and IgG2a levels were measured in sera by radial immunodiffusion (The Binding Site, Birmingham, United Kingdom) and IgE levels were measured in sera by sandwich ELISA (Pharmingen, San Diego, CA), following manufacturer’s instructions. Sera from both groups of IL-12-treated GVHD animals (injected in a single or fractionated doses) were analyzed.

Characterization of Autoantibodies

Indirect Immunofluorescence (IIF)

Antinuclear antibodies (ANAs): Sera were screened for ANAs using IIF on Hep-2 cells and on cryostatic sections from blocks composed of rat tissues (liver, kidney thymus and stomach) as described previously.^[23] The fluorescein-labeled anti-mouse conjugate was purchased from DAKO Laboratories and used at a dilution of 1/20.

Antibodies to Filagrin: These antibodies were measured by IIF using cryostatic sections of rat esophagus as described.^[24]

Analysis of RNAs Immunoprecipitated

To identify ANAs capable of binding specific snRNPs, sera were tested for their ability to immunoprecipitate subsets of small RNAs from extracts of HeLa cells. The standard assay method was used,^[25] with modifications described elsewhere.^[11]

Enzyme-immunoassay to Determine Autoantibodies in sera

Anti-DNA, anti-histones and Rheumatoid Factors (RFs) were measured by ELISA as described.^[2] *Anti-Glucose-6-phosphat antibodies* were measured by ELISA using the antigen (Sigma, Aldrich) bound to polystyrene plates at 5 µg/100 ul. The rest of the assay was performed as described.^[26]

In-vitro Spontaneous IFNγ, IL6, IL-2, IL-4 and IL-10 Production

Spleen cells (4×10^6 cells/well) from GVH and control mice were cultured in RPMI-1640 medium, (Gibco Labs, Grand Island, NY) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1% glutamine, 100 U/ml penicillin and 60 µg/ml streptomycin in 24 well plates in 2 ml of culture media at 37°C in 5% CO₂. Anti-IL2R mAb was included in the culture medium in order to inhibit consumption of

IL-2 produced by activated spleen cells from cultures. After 24, 48 and 72 h in culture, supernatants were harvested and frozen at -80°C .

IL-4 were determined in the supernatants of 24 h cultures, IL-2 and IFN γ were determined in the supernatants of 48 h cultures, and IL-6 and IL-10 were determined in supernatants of 72 h cultures, using ELISA kits purchased from Endogen (Endogen Cambridge, MA), following the manufacturer's instructions.

Ribonuclease Protection Assay for IIs mRNA Expression (RPA)

Cytokine gene expression was evaluated 2, 4 and 7 days after GVHD induction. To improve control of the IL-12 levels in blood from these animals we used the injection of fractionated rmIL-12 to GVHD mice.^[27] Spleen and thymus cells were homogenized in UltraspecTM RNA isolation system (Biotech Labs, Inc). Total RNA was isolated and quantified as described previously.^[28] RPA assay was used to quantify tissue mRNA levels. Briefly, 10 μg of total purified RNA was used in each assay along with probes for murine IL2, -5, -10, -13, -15, -9, -4, -6, -IFN γ (RiboQuant mouse cytokine multi-probe template set (mck-1), Pharmingen, San Diego, CA). To verify that equal amounts of RNA were added in each experiment, primers for the house-keeping genes L-32 and GPDH were used. Gene expression of the various IIs was quantitated by densitometry with a Fluor-STM MultiImages (BioRad)^[29] All cytokine values were normalized individually to the corresponding L32 values.

Cytotoxic Assays

Measurement of Specific and Nonspecific Cell-mediated Cytotoxicity

The effector CTL activity of freshly harvested splenocytes of GVHD mice was detected in a 4 h ^{51}Cr release assay, as described^[30] without an *in-vitro* sensitization period. Specific anti-host CTL activity was measured in the spleen of GVH disease mice using Con A-induced CAF1 blast targets. Specific anti-donor CTL activity was measured using Con A-induced Balb/c blast targets. NK cell activity was measured using YAC-1 cells as targets. Target cells were labeled for 1 h at 37°C with 50 μCi of ^{51}Cr as described.^[31] One hundred microliter aliquots were then added to the wells of microtiter plates in triplicate at various E:T ratios with spleen cells (in duplicate cultures) and incubated for 4 h in U-shaped microtiter wells. ^{51}Cr release was determined in supernatants, and specific lysis was calculated as described: % cytotoxicity = (experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release). Results are shown as the mean percent lysis \pm SEM at a given E:T ratio for each treatment group.

Measurement of *In-vitro* CTL Activity

Stimulatory Balb/c and CAF1 cells at 4×10^6 were cultured with mytomicin C (25 $\mu\text{g}/10^7$ cells) for 30 min at 37°C . Balb/c and C57BL/6 spleen cells were cultured with stimulatory CAF1 or Balb/c spleen cells (10^6) as described.^[32] Duplicated cultures containing 2.5 ng/ml of IL-12 were performed. After 5 days of culture, effector cells were tested at a different E:T ratio (double dilutions) for their ability to lyse 3-day Con A blasts from Balb/c and also CAF1 mice in a 4 h ^{51}Cr -release assay as described above.

Flow Cytometry Analysis

Cell suspensions (0.5×10^6 cells/ml) were prepared in PBS containing 2% FCS and 0.1% sodium azide. Cells were incubated with saturating amounts of one or two antibodies (dual label experiment) for 30 min on ice and then washed twice. If necessary, they were resuspended in 50 μl of Streptavidin-PE (Becton Dickinson) for 30 min on ice. After two washes, cells were fixed in 1% paraphormaldehyde and analyzed using an EPICS-XL profile (Coulter Corporation) flow cytometer, as previously described.^[3,38]

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney U test, the Student-*t* test and the Chi-square test with Yates correction.

RESULTS

GVH Disease. Clinical and Histological Studies

A total of 95 CAF1 animals were injected with spleen and lymph node cells from parental Balb/c strain. Nineteen received 2 μg of i.p. injection of mrIL-12 given in a single doses 1 h before the first semiallogenic cell injection, and 6 received a mock i.p. injection. In addition, 23 CAF1 animals were injected with 400 ng of mrIL-12 given daily for 5 days, as described above. Moreover, 6 CAF1 mice were treated with mrIL-4 before Balb/c lymphoid cell injection.

No sign of acute GVHD was induced in any animal in the GVHD groups: the CAF1 + Balb/c ($n = 41$), and the IL-12-injected CAF1 + Balb/c ($n = 42$). Ruffled fur, diarrhea and signs of immunodeficiency were not observed at any time during follow-up. No loss of thymic architecture was detected in any animal from any of these groups. Fourteen percent of the total CAF1 + Balb/c mice analyzed had deposits (2/15) and 30% developed proteinuria 12 week after GVHD induction (6/20). When IL-12 was administered, none of the 42 animals studied developed proteinuria at any time during follow-up of the disease. None of the 24 CAF1 control mice showed signs of glomerulonephritis or

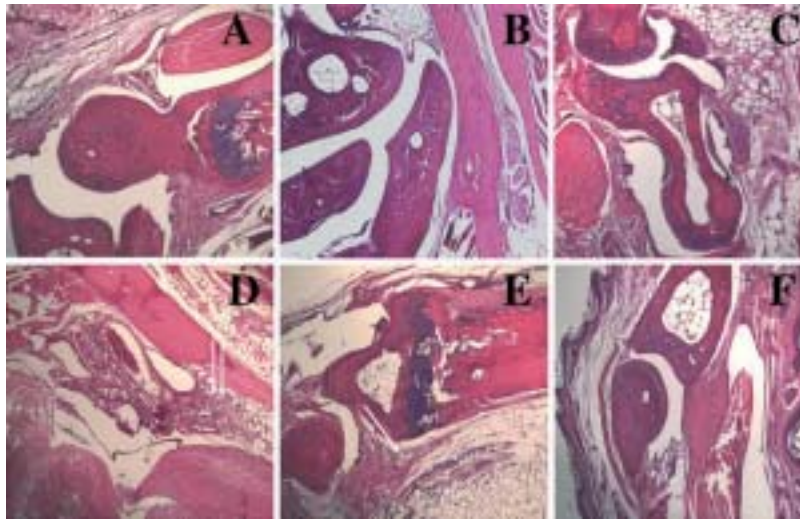


FIGURE 1 Effect of IL12 administration on arthritis-like disease in chronic GVH mice. Histologic staining (hematoxylin-eosin) of the small joints of feet from a CAF1 mouse (A), untreated CAF1; (B) IL-12-treated syngenic GVHD CAF1 mice; (C) IL-4-treated CAF1 + Balb/c GVHD mice; (D and E) non-treated CAF1 + Balb/c GVH mice; (F) IL-12-treated CAF1 + Balb/c GVHD mice. The small joints of feet from untreated but also from treated semiallogenic GVHD mice showed arthritis with inflammation of synovia (arrow) and lymphocytic infiltration (double arrow).

immunocomplex deposits in the glomeruli. No clinical signs of vasculitis or alopecia were observed in any group of mice during the follow-up of the disease.

The CAF1 recipients of Balb/c cells exhibited spleen and lymph node enlargement 2–10 days after the donor cell injection, as we described earlier. When IL-12 were co-injected with the semiallogenic donor cells, spleen weight increased. Compared to CAF1 control mice, both groups of GVHD mice showed a significant enlargement of spleen as early as 2 days after the GVHD induction ($p < 0.0046$ CAF1 + Balb/c vs. CAF1 mice and $p < 0.0001$ CAF1 + Balb/c + IL12 vs. CAF1), but differences between the two groups of GVHD animals were not statistically significant. In addition, we should mention here that no differences between IL-12-treated mice were seen after 7 and 10 days of GVHD using the two injection protocols. Neither were differences observed between uninjected and IL-12-injected groups of mice, after 5 months of study, although spleen weight was statistically higher than the CAF1 control values in both groups. No significant differences in spleen weight or lymph node enlargement were found between syngenic groups of GVHD and CAF1 controls. The IL-4 injected GVHD animals as a Th2-dependent response control group showed a significant increase in their spleen weight ($p > 0.0001$ vs. CAF1 animals, $p > 0.006$ vs. CAF1+Balb/c animals and $p > 0.003$ vs. CAF1+Balb/c + IL12 animals) (data not shown).

Five percent (1/20) of the non-treated GVHD but none of the IL-12-treated GVHD group of animals developed symmetrical forefeet inflammation 20–24 weeks after the disease induction. Foot histology at 5–6 months of GVHD evolution showed subclinical arthritis-like lesions in 70% (14/20) of non-treated GVHD animals and in 41% of the IL-12-treated GVHD animals studied by histological

methods (7/17). The IL-4 injected control group of animals showed clinical symmetric inflammation in 16.6% (1/6) of animals and 100% (6/6) developed subclinical RA-like lesions. Histological changes consisted of the presence of lymphocytes and neutrophils infiltrating the dermis and the presence of focal areas of slight to medium thickness in the synovia layers. Figure 1 shows representative images of the groups studied. Without IL-12 treatment, one animal showed a focal area of damage in the periosteum and 9/20 had cellular infiltrates and proliferation of the synovial layer. In addition, forefeet skin infiltrates were found in 10 animals in this group. After a single dose of 2 μ g of mrIL-12, one animal presented a slight lesion of the periosteum, 4 had cellular infiltrates and proliferation of the synovial layer, and another 4 mice had forefeet skin infiltrates. Five of the six animals from the mrIL-4 injected control group of animals showed synovitis defined as above, and four showed forefeet skin infiltrates (Table I).

In addition, liver and kidney histology showed the presence of cellular infiltrates in 31.5% (6/19) of the IL-12-non-treated GVHD animals studied. These infiltrates were mainly lymphocytes and polymorphonuclear cells localized around small vessels. None of the GVHD animals treated with IL-12 (0/12) showed infiltrates in the liver or in the kidney at autopsy (4–6 months of follow-up) (data not shown).

Serologic Changes in CAF + Balb/c GVHD Model after *In Vivo* IL-12 Injection

After semiallogenic stimulus, the IgG, IgG1, IgG2a and IgE immunoglobulin levels from the recipient animals increased significantly ($p < 0.005$) between 7–30 days of the course of the disease (Fig. 2A). *In vivo*

TABLE I Development of rheumatoid factors and glucose-6-phosphate isomerase (GPI) during the course of cGVHD in untreated and treated with IL12 mice

Group	Time follow-up	IgM RF (humanIgG)	GPI	Forefeet skin	Synovia
GVHD+IL12		0.2687	-	++	-
GVHD+IL12		0.2944	+	+	-
GVHD+IL12		0.3049	+	-	-
GVHD+IL12		0.3306	+	-	-
GVHD+IL12		0.3423	-	NV	NV
GVHD+IL12		0.3446	+++	-	-
GVHD		0.3528	-	-	-
GVHD+IL12		0.368	-	-	-
GVHD+IL12		0.3715	+++	-	-
GVHD		0.4007	+++	+	-
GVHD+IL12		0.403	-	-	-
GVHD		0.4171	+++	+	-
GVHD		0.4322	-	+	-
GVHD+IL12		0.4384	-	+	++
GVHD+IL12		0.4595	-	-	-
GVHD+IL12		0.5398	+	-	++
GVHD+IL12		0.5663	+	+++	++
GVHD+IL12		0.5835	+	-	+
GVHD		0.600	+	-	+
GVHD+IL12		0.6271	-	-	+(bone)
GVHD		0.6297	+++	+	-
GVHD+IL12		0.6682	+++	-	-
GVHD		0.6708	+	-	-
GVHD+IL12		0.6998	+	-	-
GVHD		0.7282	-	-	-
GVHD+IL4		0.7352	ND	-	++
GVHD		0.740	+++	+++	++
GVHD		0.782	-	-	-
GVHD+IL4		0.783	ND	+	+
GVHD		0.807	-	-	++
GVHD		0.837	-	++	+
GVHD+IL12		0.841	+++	-	-
GVHD		0.848	-	-	++
GVHD		0.850	-	+	-
GVHD+IL4		0.929	ND	+	+++
GVHD		0.947	+	-	-
GVHD		1.000	+	+	+
GVHD+IL4		1.074	ND	++	+
GVHD+IL4		1.126	ND	-	-(bone)
GVH		1.150	+++	+	++(bone)
GVHD+IL12		1.167	-	-	-
GVHD		1.287	-	+++	++
GVHD+IL4		1.421	ND	+	+
GVHD		1.959	+	-	+
GVHD		2.931	+++	-	-

Twenty CAF1 + BALB/c mice were left untreated (GVHD) or were injected i.p. with mIL12 (GVHD + IL12) ($n = 19$) or mIL4 (GVHD + IL4) ($n = 6$) as described in "Materials and Methods" section. Serum levels of IgM RF specific for human IgG, 20 weeks after GVHD induction, and serum levels of GPI specific for murine IgG, 12 weeks after GVHD induction, were determined by ELISA. Both IgM RF and GPI values of each sample were expressed as mean OD of duplicate in the ELISA reaction. The IgM RF results were considered positive if they exceeded an OD of a 0.728 and the GPI results were considered positive if they exceeded an OD of a 0.18. These basal values were calculated with the mean \pm 3 SD and with the mean \pm 2 SD of the data from 45 normal sera, respectively. ND, not determined. The difference in GPI and RFs serum levels between CAF1 + BALB/c and CAF1 + BALB/c + IL12 were not statistically significant although there is a clear relationship between the highest values of rheumatoid factors in the untreated GVHD group of mice and those treated with mIL-4. The lowest values of rheumatoid factor are found in the GVHD group of mice treated with mIL-12.

IL-12-treatment significantly inhibited the IgG1 and IgE rise observed in the untreated group of GVHD at follow-up of the disease (Mann-Whitney $p < 0.0016$, t -test $p < 0.0004$ and Mann-Whitney $p < 0.0030$, t -test $p < 0.044$, respectively). Moreover, although not statisti-

cally significant, IgG2a levels were higher in the animals injected with IL-12 than in untreated mice (Mann-Whitney $p < 0.077$). No differences in the other immunoglobulin levels were found due to the treatment with this cytokine. As a control, a significative increase was shown in the IgG1 and IgE levels as a result of the IL-4 injection (Mann-Whitney $p < 0.0114$ and $p < 0.001$, respectively).

Autoantibodies

As early as 7 days after the semiallogenic cell injection, 7% (1/14) of mice from CAF1 + Balb/c group studied and 46% (6/13) of mice studied from CAF1 + IL-12 + Balb/c had developed antinuclear antibodies. These frequencies increased during the course of the disease and peaked (92%) at 120 days of follow-up in the CAF1 + Balb/c group (18/20). In the CAF1 + Balb/c + IL-12 group, 79% (15/19) of the animals were positive after 45 days of follow-up. Homogeneous, speckled and nucleolar patterns were observed and no differences referent to these patterns was found after IL-12 injection. Although, the following data refer to the one dose IL-12 injected group, no differences were found when sera belonging to the GVHD mice were injected with fractionated IL-12. This assessment was applicable to all the serological data presented below.

Specificities of these antinuclear antibodies, anti-dsDNA, anti-histones and anti-snRNPs were studied. No significant differences were found between groups. The mean and SEM of anti-dsDNA positives values were from CAF1+Balb/c = 0.65 ± 0.058 and CAF1 + IL-12 + Balb/c = 1.06 ± 0.106 (at 60 days after GVHD induction), and the mean and SEM of anti-histone positive values were from CAF1 + Balb/c = 1.46 ± 0.027 and CAF1 + IL-12 + Balb/c = 0.85 ± 0.031 . All animals that developed glomerulonephritis had anti-dsDNA antibodies in serum, but the inverse was not so.

Other autoantibodies studied were rheumatoid factors, anti-filagrin and anti-glucose 6-phosphate isomerase. Significant differences were found between the percentage of animals that developed RF in the CAF1 + Balb/c model vs. the same GVHD model injected with IL-12 (65 vs. 10.5%) (Chi-square with Yates correction $p = 0.0015$) as shown in Table I. A significant correlation between the production of FR and development of arthritis-like disease was also observed ($p = 0.048$) in the (CAF1 + Balb/c) model, but not in the IL-12 or IL-4-injected GVHD mice groups. No significant values of anti-GPI and anti-filagrin antibodies in sera of any group of animals were found.

IIs Production

Spontaneous production of IIs in culture was analyzed 5 months after the GVH disease (Fig. 2B). The Th1-dependent IL-2 and the inflammatory IL-6 were higher than the Th-2 dependent IL-4 in the CAF1 + Balb/c murine

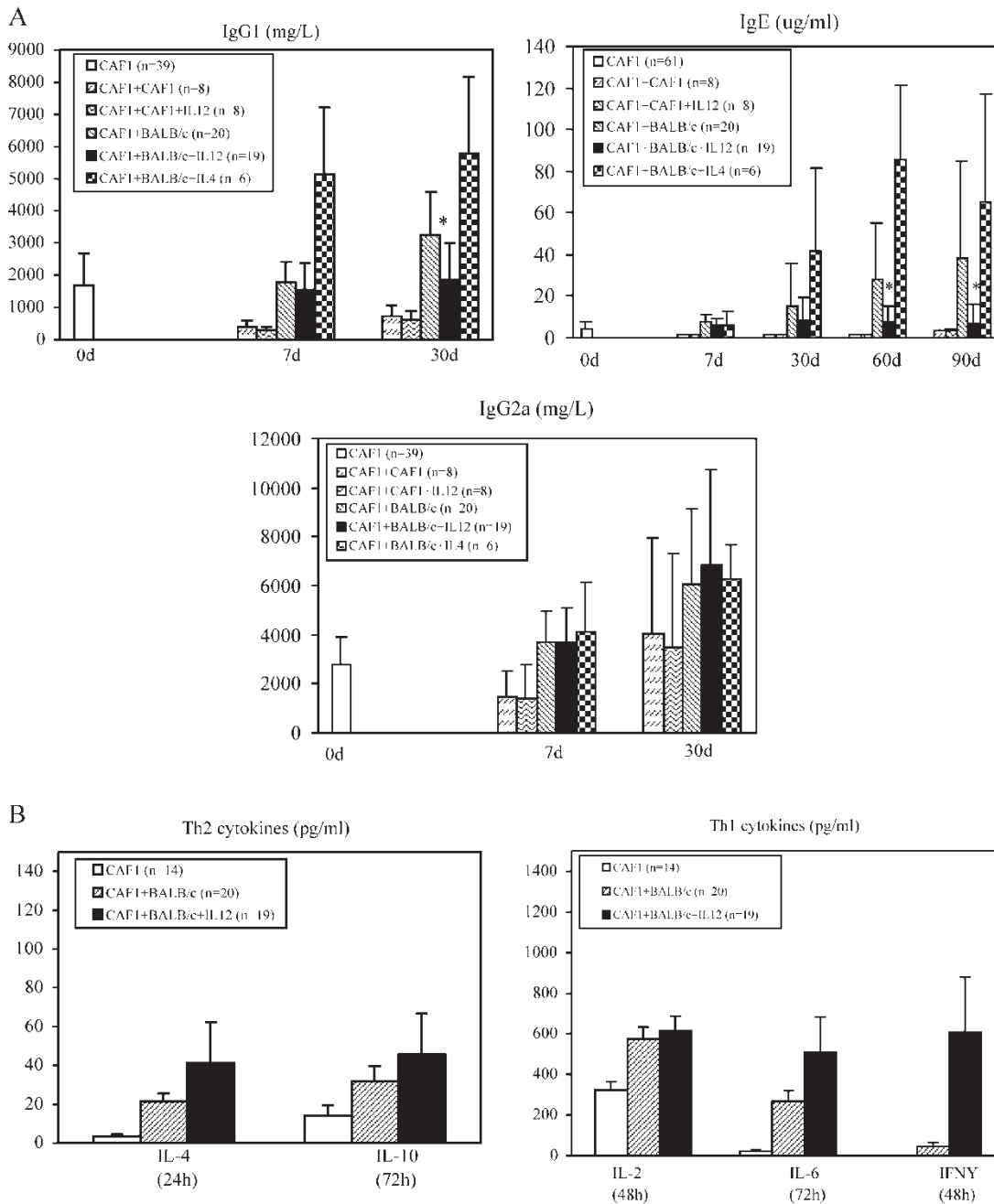


FIGURE 2 (A) IL12 inhibits differentiation of T cells to the Th2 subset in chronic GVHD mice. At the indicated days after GVHD induction ($t = 0, 7, 30, 60$ and 90 days), serum was obtained from CAF1 mice, 8 untreated and 8 treated with IL12 syngenic GVHD mice (CAF1 + CAF1 and CAF1 + CAF1 + IL12), 20 untreated and 19 treated with IL12 semiallogenic GVHD mice (CAF1 + BALB/c and CAF1 + BALB/c + IL12) and 6 treated with IL4 semiallogenic GVHD mice (CAF1 + BALB/c + IL4). Sera were tested for IgG1, IgG2a levels, by radial immunodiffusion, and for IgE levels by ELISA. Results are shown as the mean group (as indicated in the figure) \pm SD. The same number of animals was studied at the different times indicated at the bottom of each plot. (B) Five months after the GVH disease, spontaneous production of cytokines was measured in supernatants of spleen cells in culture from 19 to 20 of mice from both groups of GVH disease mice and CAF1 mice. The number of animals studied was 20 untreated and 19 IL-12-treated CAF1 + Balb/c, and 14 CAF1 control mice, with the results expressed as protein concentration based on standards.

model after GVHD induction as compared to non-injected CAF1 mice: $p > 0.00389$, $p > 0.0001$ and $p > 0.0001$, respectively. The IL-10 and IFN γ showed no significant differences in their spontaneous production after GVHD induction ($p > 0.1037$ and $p > 0.224$, respectively). The IL-12 injection resulted in a high increase of the spontaneous production of IFN γ (Mann Whitney $p > 0.345$, t -test

$p > 0.03$) and of the IL-6 (Mann-Whitney $p > 0.790$, t -test $p > 0.1908$) though not statistically significant.

Early Events in Cytokine Expression in Spleen

To determine how IL-12 would influence *in vivo* cytokine gene expression at an early phase of GVH

disease induction, groups of 5 mice (CAF1 + Balb/c, CAF1 + IL-12 + Balb/c and CAF1) were sacrificed at several times after the GVH disease induction. Splenic and thymus RNA was isolated and cytokine gene expression levels were determined by RPA. IL-12 stimulates splenic IFN gene expression, while suppressing IL-4 gene expression at 2–7 days after semiallogenic cell stimulation. Figure 3A shows arbitrary units of optical density measured by a gel image processor. All values for cytokine gene expression are normalized to the levels of the housekeeping gene, L32. Following semiallogenic cell injection in IL-12 untreated mice, IL-4, IL-10 and IL-15, as well as IFN gene expression, were found as early as 48 h after the GVHD induction in 60% (3/5), 100% (5/5), 100% (5/5) and 20% (1/5) animals, respectively. After 4 days of GVHD induction, IFN γ and IL-6 gene expression increased to 100% (5/5) and 40% (2/5) animals, respectively. The gene expression of IL-4, IL-10, IL-15 and IFN γ peaked at day 7 after GVHD. Following IL-12-injection, no statistically significant changes were seen in these ILs gene expression as shown in Fig. 3A and B. However, IL-2 was present and peaked as early as 2 days after GVHD, and at day 4, high levels of mRNA from IL-10, -13, -15, -6 and IFN γ were present; all of them but IL-6 (that peaked at day 7) were abrogated by day 7 after the semiallogenic stimulus. In thymus, IL-12 abrogates the IL-10, IL-15, IL-2 and IL-13 gene expression, otherwise increased in response to the semiallogenic cell injection. Moreover, IFN γ , IL-6 and IL-4 gene expression was found at the same or at lower levels than those found after semiallogenic cells injection without the IL-12 stimulus. Figure 3B shows a RPA example.

Differences were only statistically significant when comparing the two GVHD groups with untreated CAF1. This assay demonstrated an initial, common Th1/Th2 response in this model of GVHD, in accordance with the results we reported earlier.^[3]

Natural Killer (NK) and Cell-mediated Cytotoxicity (CTL)

NK cell activity was enhanced in chronic GVH disease mice ($n = 4$) on day 10 compared to that in control animals ($n = 4$). Exogenous IL-12, given in single doses, increased these levels although they were not statistically significant (Fig. 4A).

Untreated CAF1 + Balb/c mice developed anti-host CTL activity on day 10 of the GVHD. Anti-host CTL specific activity was enhanced after IL-12 co-injection although this was not statistically significant, as seen in Fig. 4B. When host anti-donor CTL activity was measured, very low levels were detected in both groups of GVHD mice (4 animals in each group) (Fig. 4C).

In a ⁵¹Cr-release assay we showed that *in-vitro* specific CTL activity of Balb/c compared with C57BL/6 spleen cells showed a lower response of effector

Balb/c compared with the effector C57BL/6 spleen cells when cultured with CAF1, or Balb/c blast. Figure 4D shows the mean of result from two independent experiments of responder C57BL/6 and Balb/c mice against CAF1 stimulatory CAF1 blast cells and controls. Although differences were not significant, exogenous IL-12 slightly enhanced the anti-host CTL response.

Flow Cytometric Analyses and Parental Chimerism in Spleen of GVH Disease Animals after *In Vivo* Treatment with IL-12

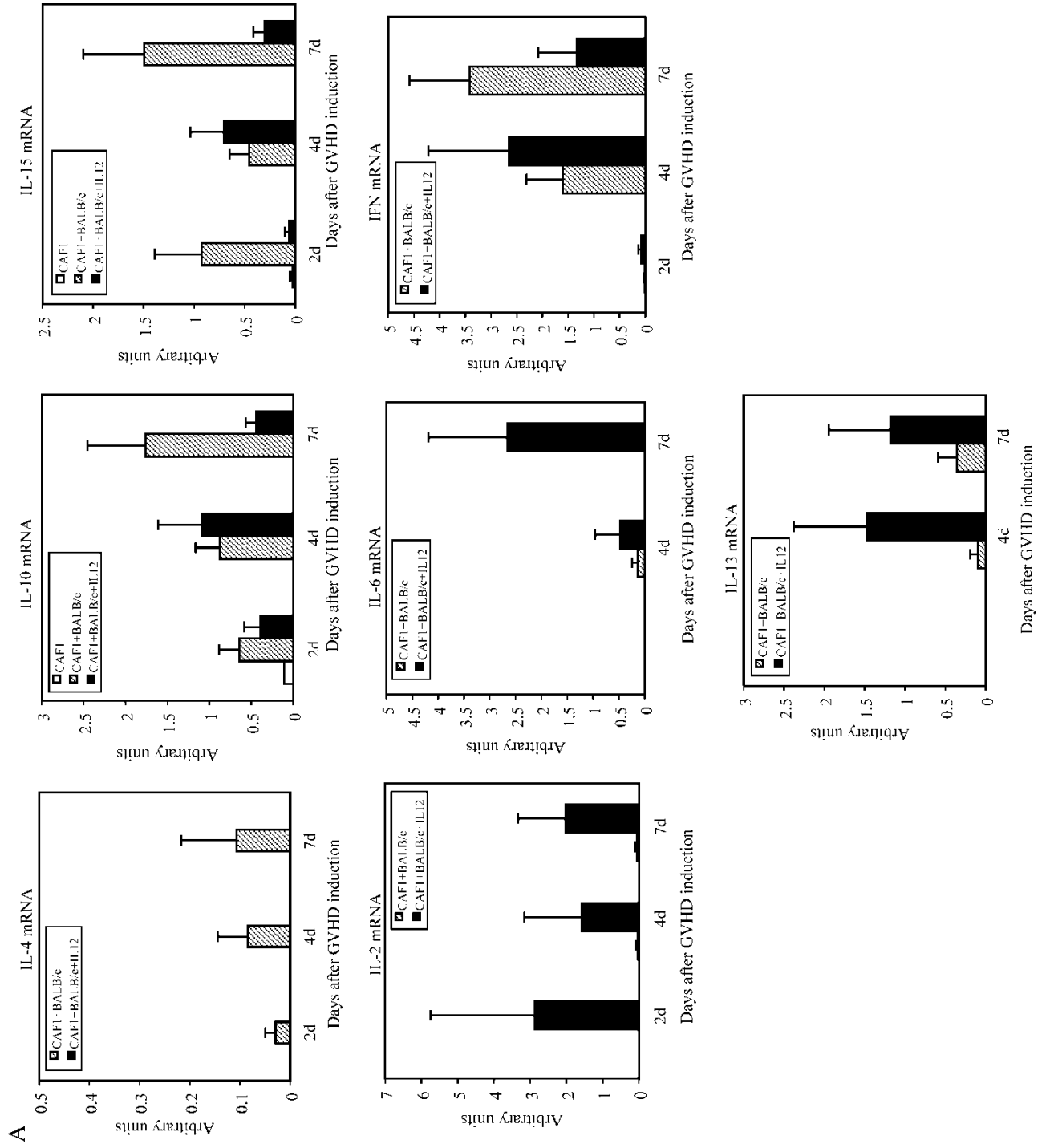
Phenotype Analysis of Total Spleen Cells

Table II shows the results of the analysis of CD4, CD8 and B220 during the follow-up of the disease. In the CAF1 + Balb/c and CAF1 + Balb/c + IL-12 group of mice, the percentage of CD4 and CD8 lymphocytes decreased after 2d of the GVHD induction when compared with CAF1 mice ($p = 0.03$), but no differences were found between groups of GVHD models. Two days later (4 days after semiallogenic cell injection), the percentage of CD8 recovered in comparison with CAF1, and the percentage of B lymphocytes decreased as compared to both CAF1 and IL-12-treated CAF1 + Balb/c group of mice. Seven days after GVH disease induction, T lymphocytes recovered and B lymphocytes decreased in relationship to normal levels in non-treated and in IL-12-treated CAF1 + Balb/c mice. We should emphasize here that 2–10 days after GVHD, a mean of 31.6% (from 17 animals studied) of spleen lymphocytes in the CAF1 + Balb/c and a mean of 40.57% (from 19 animals studied) in the CAF1 + IL-12 + Balb/c model vs. 16.5% (from 12 animals studied) in the CAF1 control mice did not react with any of the antibodies used: anti-B220, -CD4, -CD8 or Thy1.2 monoclonal antibodies. As NK activity was detected in this earlier period of the disease, the anti-NK PK136 monoclonal antibody was used, but the results were negative. Five months after GVHD induction, negative cells returned to normal levels.

Five to six months after GVHD induction, the percentage of Thy1.2, CD4 and B220 lymphocytes showed no significant differences between CAF1 + Balb/c and CAF1 + IL-12 + Balb/c groups (Table II). Of note was the increase in B lymphocytes in both groups of semiallogenic GVH disease compared with controls, as well as a significant decrease of the CD8 percentage from the CAF1 + IL-12 + Balb/c model compared with controls and CAF1 + Balb/c.

Chimerism or Repopulation by Balb/c Lymphocytes was Analyzed in the same Animals Described above

As early as 2 days after the semiallogenic cell injection, donor cells in CAF1 + Balb/c mice comprised 2.8 ± 1.8 of the total spleen cells and no differences were found when mice were co-injected with IL-12. Five to six



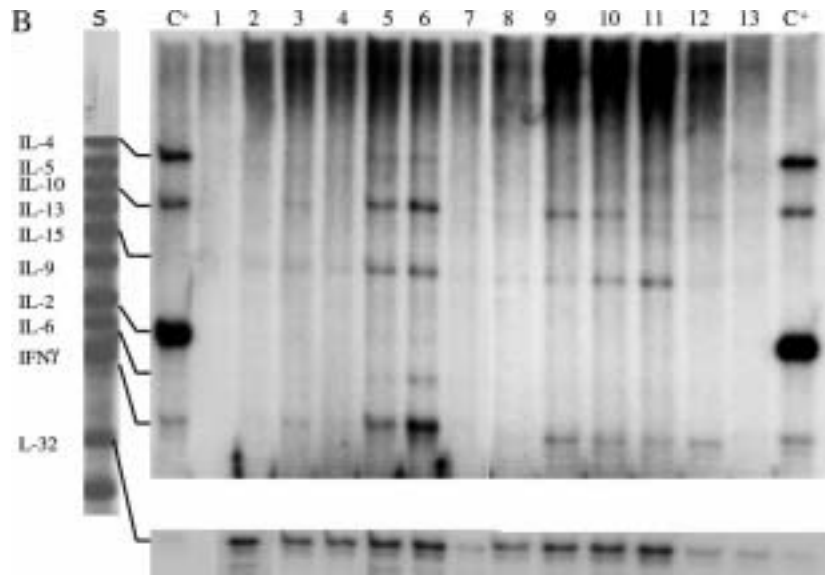


FIGURE 3 RPA analysis of interleukin gene expression. RPA analysis after 2–7 days of the GVHD induction of the Interleukin gene expression (mRNA) of uninjected and IL-12-injected CAF1 + Balb/c GVHD groups of mice (5 mice/each group/each time). (A) A histogram showing in arbitrary units the mean and SEM of the densitometry of each cytokine mRNA analyzed at 2, 4 and 7 days after the GVHD induction in 5 mice per group and time. (B) A representative experiment of a RPA analysis gel from mice of the different groups studied.

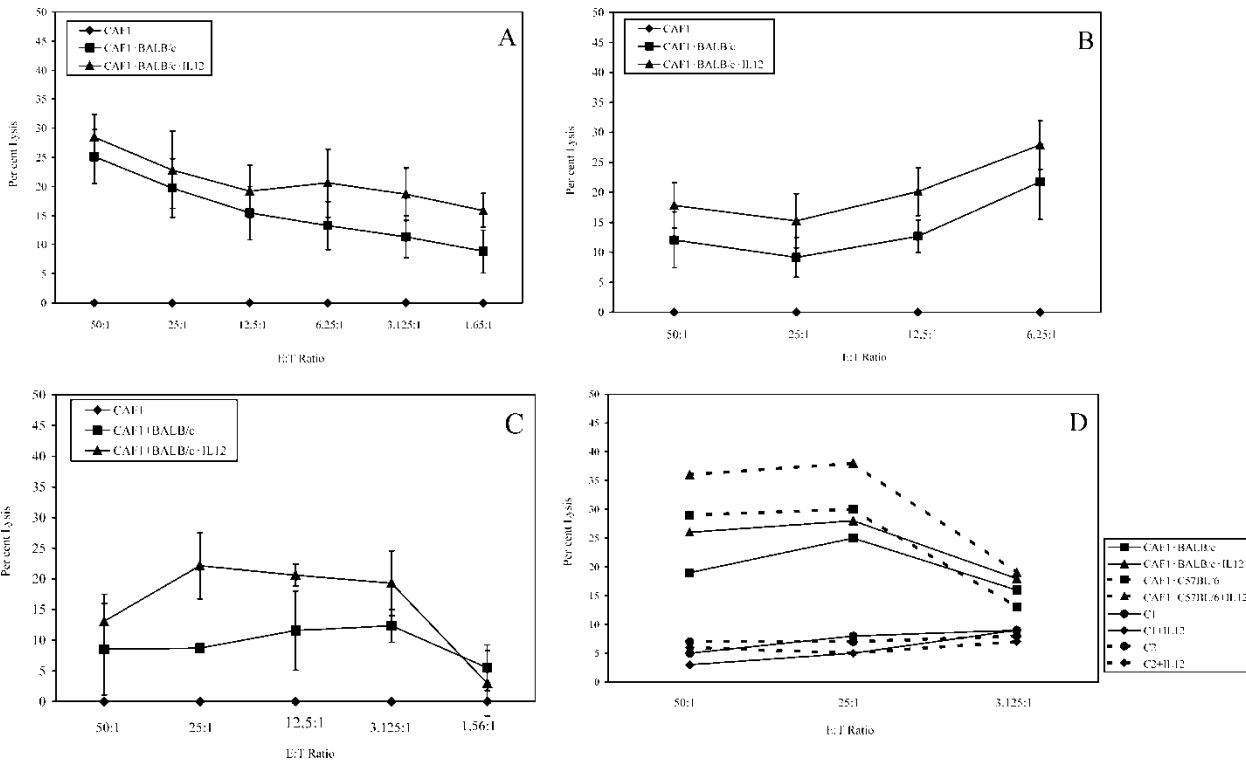


FIGURE 4 Effect of exogenous rIL-12 injection on cytotoxic activity. (A) Specific CTL activity in chronic GVHD. CTL activity against blast CAF1 cells; (B) CTL activity against blast Balb/c cells. Results are shown as the percentage of specific lysis from the media \pm SEM of three assays measured at different E:T ratios; (C) Effect of exogenous rIL-12 injection on the NK activity in cGVHD. Results are shown as the percentage of specific lysis against YAC-1 targets, measured at different E:T ratios; (D) Effect of exogenous rIL-12 injection on *in vitro* CTL assay. Results are shown as the percentage of specific lysis from the media \pm SEM of triplicates of two assays measured at different E:T ratios. CAF1 + Balb/c: responder Balb/c spleen cells stimulated in a MLC with mytomicin-treated-CAF1 spleen cells, and cultured in a secondary CTL culture with 51 Cr-labeled CAF1 blast cells; CAF1 + Balb/c + IL-12: responder Balb/c spleen cells stimulated in a MLC with mytomicin-treated-CAF1 spleen cells in the presence of IL-12 and cultured with 51 Cr-CAF1 blast cells in a secondary CTL culture; CAF1 + C56BL/6: responder C57BL/6 spleen cells stimulated in a MLC with mytomicin-treated-CAF1 spleen cells, and cultured in a secondary CTL culture with 51 Cr-labeled CAF1 blast cells; C57BL/6 + Balb/c + IL-12: responder C57BL/6 spleen cells stimulated in a MLC with mytomicin-treated-CAF1 spleen cells in the presence of IL-12 and cultured with 51 Cr-CAF1 blast cells in a secondary CTL culture; CAF1 + C57BL/6 + IL12: responder C57BL/6 stimulated as before with CAF1 in the presence of IL-12 and cultured in a secondary CTL with Caf1 blast cells; C1: control 1 consisting of CAF1 spleen cells stimulated with mytomicin treated CAF1 cells and in a secondary CTL culture with 51 Cr-CAF1 blast cells; C2: control 2 consisting of C57BL/6 stimulated in a MLC with mytomicin treated C56BL/6 and cultured in a CTL with 51 Cr-labeled CAF1 blasts.

TABLE II Spleen lymphocyte population percentage in IL-12-treated chronic GVHD mice

Group ^a	Days of GVHD	n	Thy1.2 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	B220 ⁺	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , B220 ⁺	H-2K ^{d/d}	CD4H-2K ^{d/d}	CD8H-2K ^{d/d}	B220H-K ^{d/d}
CAF1 GVHD	0	24	24 ± 1.84	18 ± 1.08	10.5 ± 0.70	55 ± 1.72	13.5 ± 1.13	—	—	—	—
	2	7	21 ± 2.97	13 ± 1.58 [†]	6.7 ± 0.53 [†]	41.58 ± 5.85	38.6 ± 7.56 [†]	2.8 ± 0.77	1.1 ± 10.47	0.19 ± 0.05	1.0 ± 0.41
	4	5	13.5 ± 1.01 [†]	10.8 ± 0.66 [†]	6.6 ± 0.60 [†]	51.5 ± 3.7	31 ± 4.47 [†]	3.9 ± 0.74	0.66 ± 0.13	0.15 ± 0.02	1.33 ± 0.26
	7	5	25 ± 2.16	21.3 ± 2.37	17 ± 2.27	39 ± 5.15 [†]	58 ± 2.77 [†]	1.5 ± 0.50	1 ± 0.46	0.32 ± 0.19	0.47 ± 0.19
GVHD + IL-12	150	20	20 ± 1.61	17 ± 1.05	10 ± 0.67	63 ± 1.39 [†]	9.7 ± 1.29 [†]	43 ± 6.87	7 ± 0.99	5.3 ± 0.45	27 ± 5.2
	2	9	18 ± 2.08	12.4 ± 1.64 [†]	6.47 ± 0.47 [†]	42.8 ± 5.49	43 ± 9.29 [†]	2.1 ± 0.69	1.06 ± 0.34	0.17 ± 0.05	1.2 ± 0.29
	4	5	13 ± 4.12 [†]	8 ± 1.61 [†]	10.4 ± 3.85	34 ± 5.20 ^{**}	47 ± 9.26 [†]	2.56 ± 0.93	0.34 ± 0.15	0.06 ± 0.06	0.41 ± 0.22
	7	5	30 ± 1.34	24 ± 2.46	22 ± 6.38	46 ± 9.31 [†]	46 ± 1.42 [†]	3.7 ± 1.84	1.6 ± 0.62	0.40 ± 0.20	1.4 ± 0.80
	150	19	20 ± 1.53 [†]	15.5 ± 1.22	8 ± 0.54 ^{†*}	61 ± 1.91 [†]	14 ± 2.01 [*]	74 ± 7.19 [*]	12 ± 1.37 [*]	8 ± 0.7 [*]	49 ± 5.43 [*]

* $p < 0.05$ between both semiallogenic mice groups.[†] $p < 0.05$ vs. CAF1.

n = number of animals studied at each documented time.

Spleens of mice were removed at indicated days after GVHD induction, and lymphocyte populations were determined by flow cytometry as described in "Materials and Methods" section. Results shown are the group mean (5 to 20 animals per group) ± SEM.

months after the GVHD disease, CAF1 + Balb/c co-injected with IL-12 showed a significantly higher degree of chimerism ($74 \pm 28\%$) than in CAF1 + Balb/c cells ($43 \pm 31\%$), $p < 0.03$. Chimerical spleen cells were mainly B lymphocytes in both groups of GVHD. Chimerical T CD4 and CD8 from total spleen lymphocytes in the CAF1 + Balb/c vs. CAF1 + IL-12 + Balb/c mice were 7 ± 4 and 5.3 ± 2 vs. 12 ± 6 and 8 ± 3 , respectively. Figure 5A shows a representative experiment.

Analysis of data in Table II shows that donor cells in 20 CAF1 + Balb/c animals comprised 16% of CD4, 12% of CD8 and 63% of B220; and donor cells in 19 GVHD animals after IL-12 treatment comprised 16% of CD4, 11% of CD8 and 66% of B220. We should emphasize that 100% of CD8 lymphocytes in the CAF1+IL-12 + Balb/c group of GVHD mice were of donor origin and CD8 from CAF1 + Balb/c mice were from the host and donor origin (50/50%).

Phenotypic Analysis of Total Thymus Cells

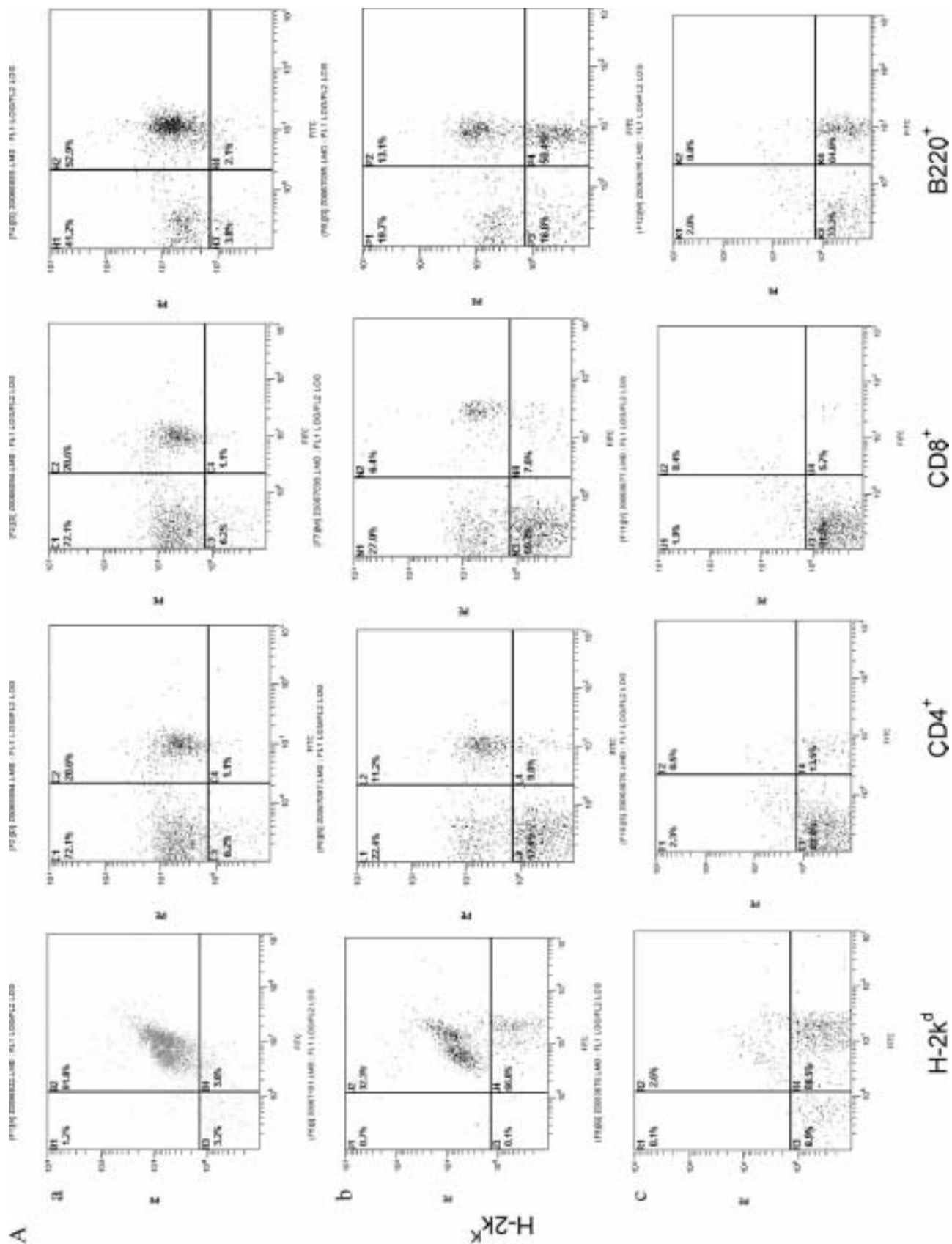
Figure 5B shows a representative study by flow cytometry of 4 animals from each model, CAF1, GVHD and GVHD + IL-12. Groups of 4–5 animals were sacrificed after 2, 4, 7, 10 and 5 month of the semiallogenic cell injection. A slight increase in the number of CD4 single positive thymocytes at 7–10 days after transplantation in the group of CAF1 + Balb/c + IL-12 in 37% (from 9 animals studied) of the animals vs. 30% (from 6 animals studied) in CAF1 + Balb/c group of mice was observed.

Parental Chimerism in Thymus of GVHD Mice after IL-12 Injection

We tested whether and to what extent donor-derived mature T cells infiltrated the thymus during GVHD. Donor-derived T lymphocytes were distinguished from mature host thymocytes by the lack of H-2K^k expression in the former (Fig. 5B shows a representative experiment). Donor-derived T cells could first be detected at 1 week after transplantation (5 animals studied from each group). They increased to $13.13 \pm 2.32\%$ (from 18 animals studied) of the total thymus lymphocytes in CAF1+Balb/c mice and to $22.59 \pm 4.66\%$ (from 18 animals studied) in IL-12-treated mice after 5 months of disease. Although differences between the two groups were not significant, the highest percentages of chimerism corresponded to the group of animals injected with IL-12.

DISCUSSION

We studied the role of the IL-12 cytokine in the GVHD-mediated arthritis-like model in the early response of graft vs. host disease and in the maintenance of the allogeneic



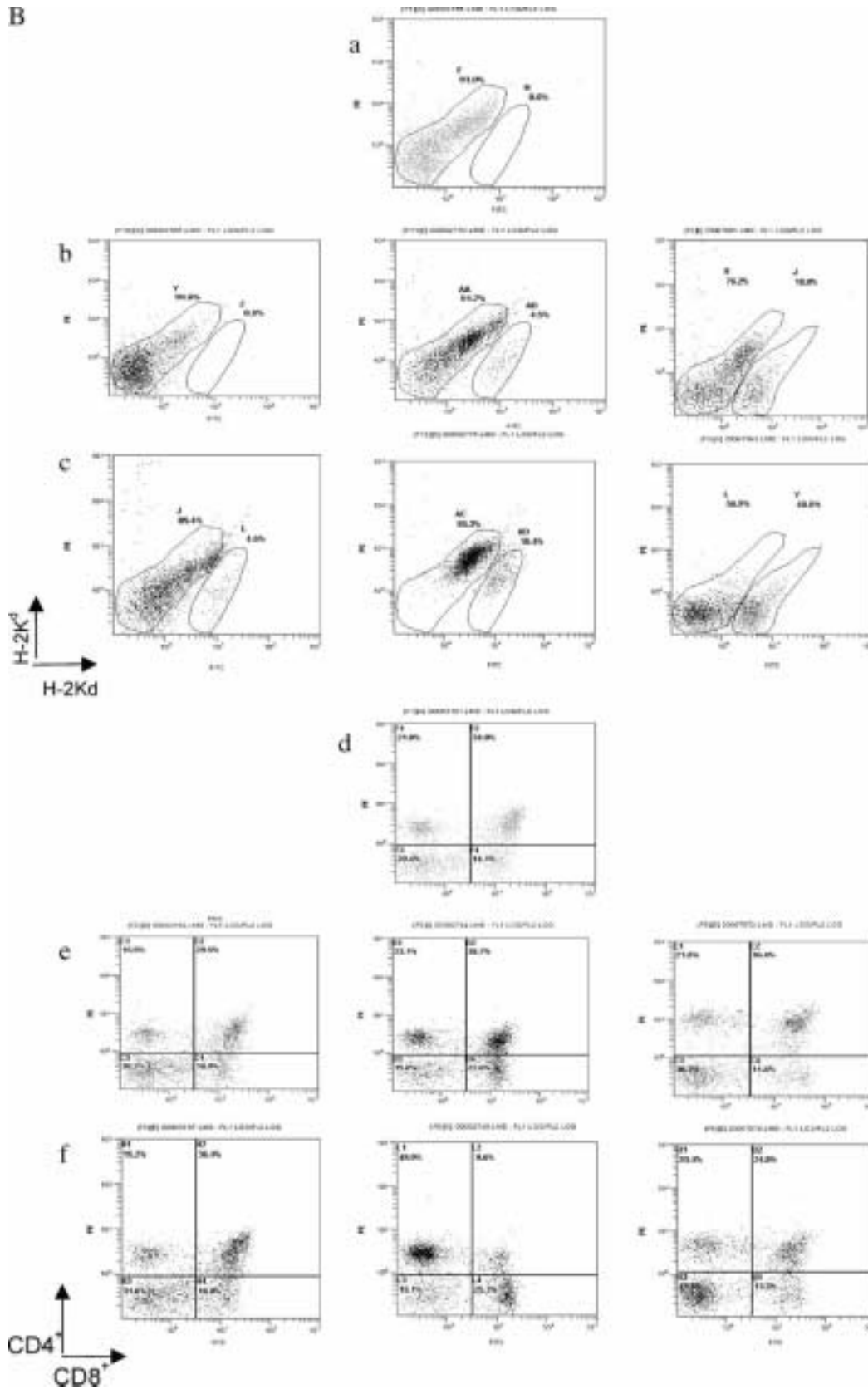


FIGURE 5 Effects of IL-12 administration on the percentage of donor origin cells in GVHD mice. (A) In spleen of chronic GVHD mice. At 5 months after GVHD induction, splenocytes from 20 CAF1 mice, 20 untreated and 19 treated with IL12 CAF1 + BALB/c mice were stained with mAb to H-2K^k and H-2K^d to determine whether the cells were of host or donor origin. Antibodies recognizing either CD4, CD8 or B220 were used simultaneously to identify the T cells subsets. Results shown are a representative experiment; (B) In thymus of chronic GVHD mice. Thymocytes cells from 20 CAF1 control mice (a and d), 18 untreated GVHD (CAF1 + BALB/c) (b and e) and 18 treated with IL12 (GVHD + IL12) (c and f) mice, were analyzed by two-color flow cytometry for cell surface markers: H-2K^k/H-2K^d, CD4⁺/CD8⁺. CAF1 host cells were distinguished from BALB/c donor-derived cells by anti- H-2K^k Abs. The figures show two representative experiments from animals studied at 6 months after the GVHD induction.

response. An increase in severity or an earlier induction of the arthritis-like signs described in the CAF1 + Balb/c model^[2,33] was expected.

Our hypothesis was that an increase in Th1 > Th2 response by the simultaneous injection of both IL-12 and semiallogenic cells would suffice to produce an acute form of GVHD and an increase in the inflammatory responses in this model (CAF1 + Balb/c).

The results show that *in vivo* treatment of CAF1 + Balb/c with the Th1-promoting cytokine IL-12 ameliorated the development of chronic GVHD without any clinical signs of acute GVHD and did not accelerate any clinical sign of arthritis. Furthermore, this treatment prevented the development of proteinuria and glomerulonephritis, accelerated the presence of ANAs in serum, and altered the balance between Th2 and Th1 response cells, leading to the elimination of most host T CD8+ lymphocytes and permitting full repopulation with donor BALB/c lymphocytes. To our knowledge, this is the first demonstration that a single IL-12 administration simultaneously with parental cell transfer ameliorates the immunological findings associated with cGVHD without inducing an acute condition. Other authors^[34] found prevention of cGVHD development using either, an IL-12-encoding DNA plasmid administration in the cGVHD model DBA/2 + DBF1 mice or IL-18 treatment.^[35] Moreover, another example of chronic GVHD across class I and II MHC antigen differences has been reported in the BDF1 + DBA/2 model. Injecting C57BL/6 parental cells into the same BDF1 host, an acute form of GVHD was found. Several authors have demonstrated that IL-12 plays a central role in the polarization of Th cell-dependent responses.^[20,36] Williamson^[37] examined the IL-12 role in polarizing the GVH disease by administering or depleting IL-12 during the afferent phase of acute GVH disease in mice. Moreover and conversely, administration of exogenous murine rIL-12 exacerbates this disease and converts the chronic GVHD into a lethal acute GVHD-like syndrome in this model, a finding not observed in the model we describe in the CAF1 strain of mice.

Flow cytometric analysis of the *in vivo*-activated spleen cells provided relevant observations. First, host T lymphocytes were the main population, which proliferated early in the CAF1 + Balb/c model also in the presence of IL-12 (data not shown). Similar results were found in other models of GVHD.^[38,39] In the (CAF1 + Balb/c + IL-12) model the presence of CD8 cells in the host from donor origin was $17 \pm 2.27\%$ after 7 days and $10 \pm 0.67\%$ after 5 months of GVHD. We should emphasize that the CD8 T cells detected were of donor origin at this later period. In contrast, CAF1 + Balb/c mice had T CD8 from both donor and host origin. We considered that the presence of donor CD8 in addition to CD4 donor cell would contribute to the early increase in the spontaneous proliferation of spleen cells as earlier described in response to allogenic stimulus.^[35] In addition, we also reported previously^[3] that donor cell

chimerism was dependent on the presence of CD8 T cells in the donor inocula. Second, we observed an increase in the negative population for the four monoclonal antibodies used (Thy1, CD8, CD4 and B220) in the earliest period of the GVHD in the CAF1 + Balb/c model compared with normal CAF1 mice. IL-12 clearly induces an increase in this population that is higher after 4 days of GVHD induction, decreasing at 7 days of GVHD induction. There was a close relationship between the presence of this negative population and the levels of IFN γ as well as the NK cytotoxic activity. Although we think that this negative population belongs to NK lymphocytes we were not able to detect any specific or significant positive reaction by flow cytometry. Third, a higher donor engraftment was demonstrated after IL-12 injection, probably as a consequence of cytotoxic activity, produced by donor T CD8 lymphocytes. Moreover, functional analysis of NK activity after 10 days of GVHD induction showed a slightly higher activity in the IL-12 injected group of GVHD animals than in the IL-12 uninjected animals, and both groups were higher than CAF1 controls. Chimerism significantly increased in spleen and thymus when IL-12 was provided with the semiallogenic stimulus. Donor cells were also detected in the thymus in both CAF1 + Balb/c and CAF1 + Balb/c + IL-12 models. This migration of donor cells to the thymus may produce a T cell maturation and anomalous ontogeny, and could be involved in the process of tolerance.

The donor CD8 cytotoxic capacity would be responsible for progressive disappearance of F1 cells and the subsequent high levels of chimerism.

In our earlier published paper, data about the percentages of donor cell chimerism were higher than those reported herein as was the percentage of the negative population.^[3] These changes may be due to the sensitivity of the cytometer, the monoclonal antibodies used, or differences in the origin of the mice.

Furthermore, the fact that the disease did not progress to acute GVHD after IL-12-treatment may be due to the reduction in the number of donor CD8 + T cells, their differentiation to CTLs, or to host Veto cells development. Our results show a reduction in the CD8 percentage in cGVHD mice treated with IL-12. These results were in accordance with previous studies where it was shown that high doses of IL-12 administered to mice can lead to depletion of splenic CD4 and CD8 cells and can inhibit CD8 T cell expansion and their CTL activity.^[40]

Preventing conversion into an acute phenotype in IL-12-treated mice could also be related to the increase of IFN γ levels found in these mice. Another possibility to prevent acute GVHD has been suggested to be IFN γ -independent. IFN γ knockout mice used as donors in a mouse acute GVHD model accelerated acute GVHD-associated morbidity.^[41] In our model, the results suggest that IFN γ cytokine does not play a significant role in causing acute GVHD in the CAF1 + Balb/c model as the semiallogenic IL-12-untreated model had high levels of IFN γ and IL-2 at the earliest period of the GVHD, both

ascribed to a Th-1 response. Moreover, Yang *et al.*,^[42] demonstrated that a single injection of IL-12 on the day of allogeneic transplantation inhibits acute GVHD in mice and that IL-12 mediated GVHD protection would be dependent on the ability of Balb/c donors to produce IFN γ . At least in this model, IL-12 is likely to be insufficient to induce acute GVHD and would need a combination with other/s cytokine/s.^[43–45]

Activated macrophages secrete a range of cytokines that have a variety of local and distant effects, including interleukin-1, IL-6, IL-12, TNF α and chemokine IL-8. All have marked local and systemic effects, which contribute to both innate and adaptive immunity. Local effects of IL-6 can be summarized as lymphocyte activation and increased antibody production. Moreover, IL-6 has been described to be up regulated and to play an inflammatory role in rheumatoid arthritis.^[46] We demonstrated the presence of IL-6 in spleen cell supernatants of cGVHD mice injected with IL-12 and locally in the thymus a short time after the GVHD induction. In our opinion IL-12 may activate NK cells and induce the differentiation of CD4 T cells into Th1 cells.

As described,^[47] comparing cells from most strains of mice, activated CD4 + T cells from BALB mice show a bias towards IL-4 production and T helper 2 commitment *in-vitro* and *in vivo*. However, poor IL-4 were found in the CAF1 model both in the RPA experiments and in the spleen supernatants.

Finally, we cannot rule out the possibility that the lack of some expected effect of IL-12, such as the induction of an acute GVH disease or an effect in the arthritis-like lesions, occurred because of the dose of IL-12 and the treatment regimen used in our experiment. We consider that IL-12 injection culminates in a cytotoxic mechanism of host cells, thus impeding their anti-donor response and homing in the host tissues without destroying them, probably because the effect of host Veto cells. In addition, preliminary experiments suggested a low cytotoxic activity of Balb/c effector cells compared with other mouse strain cells such as C57BL/6.

In conclusion, these results suggest that the Th1 > Th2 shift produced by the *in vivo* injection of IL-12 in chronic GVHD induced in the CAF1 + Balb/c model described was not sufficient to develop an acute form of GVHD. Moreover, although in earlier studies others authors as well as ourselves suggested that the inflammatory T lymphocytes would be responsible for the arthritis-like symptoms, in this paper an increase of inflammatory Th1 lymphocytes seems to play no role in the arthritis-like signs.

Acknowledgements

We thank Ms Carolyn Newey for her assistance with the preparation of the manuscript. This work was supported by a grant from the “Ministerio de Educación y Ciencia” (SAF97/0123), a grant from the “Fondo de

Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social) and a grant from the “Generalitat de Catalunya” CIRIT (Spain).

References

- [1] Gelpi, C., Rodriguez-Sanchez, J.L., Martinez, M.A., Craft, J. and Hardin, J.A. (1988) “Murine graft versus host disease: a model for study of mechanisms that generate autoantibodies to ribonucleoproteins”, *J. Immunol.* **140**, 4160–4166.
- [2] Gelpi, C., Martinez, M.A., Vidal, S., Algueró, A., Juárez, C., Hardin, J. and Rodríguez-Sánchez, J.L. (1990) “Different strains of donor parental lymphoid cells induced different models of chronic graft-versus-host disease in murine (Balb/c \times A/J)F1 hybrid hosts”, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **56**, 298–310.
- [3] Vidal, S., Labrador, M., Rodriguez-Sanchez, J.L. and Gelpi, C. (1996) “The role of Balb/c donor CD8+ lymphocytes in graft-versus host disease in (Balb/c \times A/J)F1 (CAF1) Mice”, *J. Immunol.* **156**, 997–1005.
- [4] Trembleau, S., Germann, T., Gately, M.K. and Adorini, L. (1995) “The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases”, *Immunol. Today* **68**, 333–336.
- [5] Chen, E., Keystone, E.C. and Fish, E.N. (1993) “Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum.* **36**, 901–910.
- [6] Morita, Y., Yamamura, M., Nishida, K., Harada, S., Okamoto, H., Inoue, M., *et al.* (1998) “Expression of interleukin-12 in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum.* **41**, 306–314.
- [7] Parks, E., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Gauldie, J., Hitt, M., Graham, F.L. and Kunkel, S.L. (1998) “Transient gene transfer of IL-12 regulates and disease severity in experimental arthritis”, *J. Immunol.* **160**, 4615–4619.
- [8] Joosten, L.A.B., Lubberts, E., Helsen, M.A. and van Den Berg, W.B. (1997) “Dual role of IL-12 in early and late stages of murine collagen type II arthritis”, *J. Immunol.* **159**, 4094–4102.
- [9] Kasama, T., Yamazaki, J., Hanaoka, R., Miwa, Y., Hatano, Y., Kobayashi, K., Negishi, M., Ide, H. and Adachi, M. (1999) “Biphasic regulation of the development of murine type II collagen-induced arthritis by interleukin-12: possible involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha”, *Arthritis Rheum.* **42**, 100–109.
- [10] McIntyre, K.W., Schuster, D.J., Gilly, K.M., Warrier, R.R., Connaughton, S.E., Hall, L.B., *et al.* (1996) “Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in IL-12-deficient mice”, *Eur. J. Immunol.* **26**, 2933–2938.
- [11] Sveliga, J., Hess, H., Rude, E., Schmitt, E. and Germann, T. (1996) “IL-12 promotes cellular but not humoral type II collagen-specific Th1-type responses in C57BL/6 and B10.Q mice and fails to induce arthritis”, *Int. Immunol.* **8**, 1221–1227.
- [12] Joosten, L.A.B., Heuvelmans-Jacobs, M., Lubbert, E., van de Loo, F.A.J., Bakker, A.C., Helsen, M.M.A., Richards, C.D. and van der Berg, W.B. (2002) “Local interleukin-12 gene transfer promotes conversion of an acute arthritis to a chronic destructive arthritis”, *Arthritis Rheum.* **46**, 1379–1389.
- [13] Hess, H., Gately, M.K., Rude, E., Schmitt, E., Szeliga, J. and Germann, T. (1996) “High doses of IL-12 inhibit the development of joint disease in DBA/1 mice immunized with type II collagen in complete Freund’s adjuvant”, *Eur. J. Immunol.* **26**, 187–191.
- [14] Peeva, E., Fishman, A.D., Goddard, G., Wadler, S. and Barland, P. (2000) “Rheumatoid arthritis exacerbation caused by exogenous interleukin-12”, *Arthritis Rheum.* **43**, 461–463.
- [15] Kim, W.U., Min, S.Y., Cho, M.L., Youn, J., Min, J.K., Lee, S.H., *et al.* (2000) “The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA)”, *Clin. Exp. Immunol.* **119**, 175–181.
- [16] Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A. and Mosedale, B. (1980) “Immunization against heterologous type II collagen-induced arthritis in mice”, *Nature* **2843**, 666–668.
- [17] Joosten, L.A.B., Lubberts, E., Durez, P., Helsen, M.M.A., Jacobs, M.J.M., Goldman, M. and van den Berg, W.B. (1997) “Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis”, *Arthritis Rheum.* **40**, 249–260.
- [18] Dey, B.R., Yang, Y.G., Szot, G.L., Pearson, D.A. and Sykes, M. (1998) “Interleukin-12 inhibits graft-versus-host disease through

- a Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T-cell activation and expansion”, *Blood* **91**, 3315–3322.
- [19] Sykes, M., Pearson, D.A., Taylor, P.A., Szot, G.L., Goldman, S.J. and Blazar, B.R. (1999) “Dose and timing of interleukin (IL-12) and timing and type of total-body irradiation: effects on graft-vs-host disease inhibition and toxicity of exogenous IL-12 in murine bone marrow transplant recipients”, *Biol. Blood Marrow Transplant.* **5**, 277–284.
- [20] Via, C.H.S., Rus, V., Gately, M.K. and Finkelman, F. (1994) “IL-12 stimulates the development of acute graft-versus-host disease in mice that normally would develop chronic, autoimmune graft-versus-host disease”, *J. Immunol.* **153**, 4040.
- [21] Fowler, D.H., Kurasawa, K., Husebekk, A., Cohen, P.A. and Gress, R.E. (1994) “Cells of Th2 cytokine phenotype prevent LPS-Induced lethality during murine graft-versus-host reaction”, *J. Immunol.* **152**, 1004–1009.
- [22] Gelpi, C., Martinez, M., Vidal, S., Targoff, I.N. and Rodriguez-Sanchez, J.L. (1994) “Anti-transfer RNA associated protein antibodies in a murine model of chronic graft versus host disease”, *J. Immunol.* **152**, 1989–1999.
- [23] Weber, K.T., Bibring, T. and Osborn, M.L. (1975) “Specific visualization of tubulin containing structures in tissue culture cells by immunofluorescence”, *Exp. Cell Res.* **95**, 111–114.
- [24] Vincent, C., Serre, G., Lapeyre, F., Fournié, B., Ayrolles, C., Fournié, A., *et al.* (1989) “High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat esophagus epithelium, so-called “antikeratin antibodies””, *Ann. Rheum. Dis.* **48**, 712–722.
- [25] Lerner, M.R. and Steitz, J.A. (1979) “Antibodies to small nuclear RNAs complex with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus”, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **76**, 5495–5498.
- [26] Matsumoto, I., Maccioni, M., Lee, D.M., Maurice, M., Simmons, B., Brennr, M., Mathis, D. and Benoist, C.H. (2002) “How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease”, *Nat. Immunol.* **3**, 360–365.
- [27] Morris, S.C., Madden, K.B., Adamovicz, J.J., Gause, W.C., Hubbard, B.R., Gately, M.K. and Finkelman, F.D. (1994) “Effects of IL-12 in *in-vivo* cytokine gene expression and Ig isotype selection”, *J. Immunol.* **152**, 1047–1056.
- [28] Svetiv, A., Finkelma, F.D., Jian, T.C., Dieffenbach, C.W., Scott, D.E., Mc Carthy, K.F., Steinberg, A.D. and Gauser, W.C. (1991) “Cytokine gene expression after *in vivo* primary immunization with goat antibody to mouse IgD antibody”, *J. Immunol.* **147**, 2391–2397.
- [29] Mariner, J.M., Lantz, V., Waldmann, T.A. and Azimi, N. (2001) “Human T cell lymphotropic virus type I tax activates IL-15R α gene expression through a NF-kB site”, *J. Immunol.* **166**, 2602–2609.
- [30] Shustov, A., Nguyen, P., Finkelman, F.D., Elkon, K.B. and Via, C.S. (1998) “Differential expression of Fas and Fas ligand in acute and chronic graft-vs-host disease: up-regulation of Fas and Fas ligand requires CD8+ T cell activation and IFN- γ production”, *J. Immunol.* **161**, 2848–2855.
- [31] Via, C.S., Sharrow, S.O. and Shearer, G.M. (1987) “Role of cytotoxic T lymphocytes in the prevention of lupus-like disease occurring in a murine model of graft-versus-host disease”, *J. Immunol.* **139**, 1840.
- [32] Lamouseé-Smith, E.S.N., Dougall, D.S. and McCarthy, S.A. (1999) “Cytokine requirements for production of a novel anti-CD8-resistant CTL population”, *J. Immunol.* **163**, 4160–4167.
- [33] Gleichmann, E., Pals, S.T., Rolink, A.G., Radaszkiewicz, T. and Gleichmann, H. (1984) “Graft-versus-host reactions: clues to the etiopathology of a spectrum of immunological diseases”, *Immunol. Today* **5**, 324–327.
- [34] Okubo, T., Hagiwara, E., Ohno, S., Tsuji, T., Ihata, A., Ueda, A., Shirai, A., Aoki, I., Okuda, K., Miyazaki, J. and Ishigatsubo, Y. (1999) “Administration of an IL-12-encoding DNA plasmid prevents the development of chronic graft-versus-host disease (GVHD)”, *J. Immunol.* **162**, 4013–4017.
- [35] Okamoto, I., Kohno, K., Tanimoto, T., Iwaki, K., Ishihara, T., Akamatsu, S., Ikegami, H. and Kurimoto, M. (2000) “IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice”, *J. Immunol.* **164**, 6067–6074.
- [36] Sykes, M., Szot, G.L., Nguyen, P.L. and Pearson, D.A. (1995) “IL-12 inhibits murine graft-versus-host disease”, *Blood* **86**, 2429–2438.
- [37] Williamson, E., Garside, P., Bradley, J.A. and Mowat, A.M. (1996) “IL-12 is a central mediator of acute graft-versus-host disease in mice”, *Immunol* **157**, 689–699.
- [38] Sprent, J.M., Schaefer, M. and Korngold, R. (1990) “Role of T cell subsets in lethal graft-versus-host disease directed to class I versus class II H-2 differences. II. Protective effects of L3T4+ cells in anti-class II GVHD”, *J. Immunol.* **144**, 2946–2953.
- [39] Gleichmann, E., Pals, S.T., Rolink, A.G., Radaszkiewicz, T. and Gleichmann, H. (1984) “Graft-versus-host reactions: clues to the etiopathology of a spectrum of immunological diseases”, *Immunol. Today* **5**, 324–328.
- [40] Orange, J.S., Wolf, S.F. and Birob, C.A. (1994) “Effects of IL-12 on the response and susceptibility to experimental viral infections”, *J. Immunol.* **152**, 1253–1264.
- [41] Murphy, W.J., Welniak, L.A., Taub, D.D., Wiltrott, R.H., Taylor, P.A., Vallera, D.A., Kopf, M., Young, H., Longo, D.L. and Blazar, B.R. (1998) “Differential effects of the absence of interferon- γ and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice”, *J. Clin. Invest.* **102**, 1742–1748.
- [42] Yang, Y.G., Sergio, J.J., Pearson, D.A. and Sykes, M. (1998) “Donor derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-vs-host disease by interleukin 12”, *J. Clin. Invest.* **102**, 2126–2135.
- [43] Laureys, B.R., Renauld, J.C. and Houssiau, F.A. (1998) “Inhibition of *in vitro* immunoglobulin production by IL-12 in murine chronic graft-vs-host disease: synergism with IL-18”, *Eur. J. Immunol.* **28**, 2017–2024.
- [44] Fantuzzi, G., Reed, D.A. and Dinarello, ChA. (1999) “IL-12-induced IFN γ is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor”, *J. Clin. Invest.* **104**, 761–767.
- [45] Tomura, M., Zhou, X.Y., Maruo, S., Ahn, H.-J., Hamaoka, T., Okamura, H., Nakanishi, K., Tanimoto, T., Kurimoto, M. and Fujiwara, H. (1998) “A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1 + CD3- cells”, *J. Immunol.* **160**, 4738–4746.
- [46] Feldmann, M., Brennan, F.M. and Maini, R.N. (1996) “Rheumatoid Arthritis”, *Cell* **85**, 307–310.
- [47] Bix, B.M., Wang, Z., Thiel, B., Schork, N.J. and Locksley, R.M. (1989) “Genetic regulation of commitment to IL-4 T cell-intrinsic mechanism”, *J. Exp. Med.* **188**, 2289–2299.