

Expresión de IL-10 y CD40L en pacientes de lupus eritematoso

IL-10 and CD40L expression in patients with lupus erythematosus

Departamento de Biología Funcional,
Área de Inmunología,
Universidad de Oviedo

López Suárez P.
Suárez Díaz A.

RESUMEN

Objetivo. Conocer el papel de los polimorfismos de la IL-10 en la susceptibilidad a padecer lupus eritematoso discoide (LED) y sistémico (LES) e investigar el efecto de la atorvastatina en la expresión de CD40L e IL-10.

Métodos. Se determinó la frecuencia de tres polimorfismos presentes en el promotor de la IL-10 en 248 pacientes de lupus (192 LES y 56 LED) y 343 controles mediante amplificación por PCR e hibridación con sondas específicas de alelo. Se estudió la expresión de CD40L usando citometría de flujo y la concentración de IL-10 en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA.

Resultados. Encontramos asociación del genotipo alto productor de IL-10 (-1082GG) con riesgo de desarrollar LED (OR = 2,10, $p = 0,029$). La frecuencia de anticuerpos anti-dsDNA fue mayor en los pacientes de LES altos productores de IL-10 ($p = 0,085$). La expresión de CD40L en linfocitos T disminuye en presencia de atorvastatina. La producción de IL-10 por linfocitos T y monocitos estimulados es inhibida en presencia de atorvastatina, mientras que la IL-10 producida de forma basal por monocitos no es reducida por esta estatina.

Conclusión. El genotipo alto productor de IL-10 se asocia con susceptibilidad a padecer LED y con una mayor prevalencia de anticuerpos anti-dsDNA. La presencia de atorvastatina inhibe la expresión de CD40L e IL-10 tras estimulación celular, pero es incapaz de reducir la producción constitutiva de IL-10 por monocitos.

Palabras clave: IL-10, CD40L, atorvastatina, lupus.

López Suárez P, Suárez Díaz A
Expresión de IL-10 y CD40L en pacientes de lupus eritematoso
Mapfre Medicina, 2005; 16: 95-105

ABSTRACT

Objective. To know the involvement of IL-10 cytokine promoter polymorphisms on discoid (DLE) and systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility in Northern Spanish patients and to investigate the effects of statins on CD40L and IL-10 expression.

Methods. The frequency of three nucleotide polymorphisms on IL-10 (1082, -819 and -592) gene promoter was determined in 248 lupus patients (192 SLE and 56 DLE) and 343 matched control individuals by PCR amplification and hybridization with allele specific probes. The expression of CD40L was studied using cytometric analysis and IL-10 concentration in culture supernatants was determined by ELISA techniques.

Results. The -1082 GG high IL-10 producer genotype was associated with an increased risk to develop DLE (OR = 2,10, $p = 0,029$). The frequency of antibodies to dsDNA was higher in high IL-10 producer patients with SLE ($p = 0,085$). CD40L expression on T lymphocytes was decreased with atorvastatin. IL-10 production by stimulated T lymphocytes and monocytes was inhibited by atorvastatin whereas basal monocyte production was not reduced.

Conclusions. High IL-10 producer genotype was associated with susceptibility to DLE and with increased prevalence of antibodies anti-dsDNA in Northern Spanish patients. The presence of atorvastatin inhibits CD40L and IL-10 expression after cellular stimulation but it is unable to reduce IL-10 constitutive production by monocytes.

Key Words: IL-10, CD40L, atorvastatin, lupus.

López Suárez P, Suárez Díaz A
IL-10 and CD40L expression in patients with lupus erythematosus
Mapfre Medicina, 2005; 16: 95-105

Correspondencia:

Patricia López Suárez
Departamento de Biología Funcional, Área de Inmunología
Facultad de Medicina.
Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo
E-mail: tryyls@terra.es

Fecha de recepción: 23 de noviembre de 2004

Este trabajo ha sido financiado por FICYT y con una Ayuda a la Investigación de la Fundación MAPFRE Medicina

INTRODUCCIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una patología autoinmune, de etiología desconocida, en la que se pueden ver lesionados diversos órganos como consecuencia del depósito y la producción *in situ* de inmunocomplejos circulantes.

En los pacientes de LES se ha observado una hiperactividad de los linfocitos B dando lugar a la formación de autoanticuerpos. Esta producción es T-dependiente, siendo necesaria la interacción CD40/CD40L. En dichos pacientes se ha visto una hiperexpresión de CD40L, no sólo en linfocitos T activados, sino también en linfocitos B y monocitos de forma basal (1-4). El papel de esta molécula es claramente patogénico por su efecto promotor de la aterogénesis, complicación habitual en estos pacientes que suelen presentar hipercolesterolemia al generar anticuerpos frente a lipoproteínas sanguíneas (5). La expresión aberrante de CD40L parece estar implicada en la hiperactividad de las células B, por lo que en este estudio se pretende investigar la expresión de esta molécula en pacientes lúpicos así como la regulación de la misma por fármacos inmunomoduladores, como las estatinas.

La hiperactividad de los linfocitos B también es dependiente de factores solubles moduladores de su activación, como son las citocinas. En esta patología, con predominio de Th2, se han encontrado niveles elevados de citocinas inmunosupresoras y particularmente de la IL-10 (6-8). Esta citocina es un potente activador de linfocitos B, incrementando la producción de autoanticuerpos (9). Se ha encontrado una variación entre individuos sanos en la producción *in vivo* de esta citocina que está regulada genéticamente por tres polimorfismos bialélicos localizados en las posiciones -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A) del promotor del gen de la IL-10, dando lugar a los tres haplotipos, GCC, ACC y ATA, correspondientes a genotipos altos, bajos e intermedios productores de IL-10, respectivamente (10, 11). Los niveles elevados de IL-10 en pacientes de LES podrían tener un componente genético predisponiendo a padecer la enfermedad. Por este motivo, en el presente trabajo se estudió el genotipo de la IL-10 para los polimorfismos citados en los pacientes lúpicos asturianos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

En el estudio participaron 248 pacientes de Lupus Eritematoso, de los cuales 192 presenta-

ban diagnóstico de LES al reunir al menos 4 de los criterios diagnósticos establecidos por el *American College of Rheumatology (ACR)* (12); los 56 pacientes restantes fueron diagnosticados clínica e histológicamente de LED. Los individuos control (n = 343) fueron donantes sanguíneos voluntarios del Centro Comunitario de Transfusiones, Oviedo.

Las características demográficas e inmunológicas de los pacientes de Lupus Eritematoso se resumen en la Tabla I.

TABLA I. Características demográficas e inmunológicas de los pacientes de Lupus Eritematoso

Pacientes de LE	248
Hombres/Mujeres	29/219
Pacientes de LED	56
Mujeres (%)	71,4
Media edad de diagnóstico (años) $\pm$ sd	43,0 $\pm$ 13,4
Pacientes de LES	192
Mujeres (%)	93,2
Media edad de diagnóstico (años) $\pm$ sd	34,6 $\pm$ 14,7
Presencia de autoanticuerpos (%):	
anti-SSa	30,6
anti-SSb	14,4
anti-RNP	13,3
anti-Sm	9,4
anti-dsDNA	66,7

sd: desviación típica.

Detección de autoanticuerpos

Se cuantificaron anticuerpos anti-DNA de doble cadena (dsDNA) por radioinmunoensayo (RIA) (Trinity Biotech plc, Bray, Irlanda) o ELISA (ELIA dsDNA, Pharmacia, Freiburg, Alemania). Se detectó la presencia de anticuerpos frente a anti-Ro/SSa, anti-La/SSb, anti-RNP y/o anti-Sm por ELISA cuantitativo (Orgentec, Mainz, Alemania) y en las muestras positivas se determinó la especificidad de los autoanticuerpos por *immunoblotting* (Inno-Lia, Innogenetics, Ghent, Bélgica) o ELISA específico (Orgentec) dependiendo del autoantígeno frente al que van dirigidos.

Extracción de ADN

Las muestras sanguíneas de pacientes y controles se recogieron, con el consentimiento de

ambos, en tubos de EDTA. A partir de sangre total se lisaron las células rojas usando RBC (red blood cell lysis buffer, NH_4HCO_3 0,05 mM y NH_4Cl 5 mM) y las células blancas con WCLB (white blood cell lysis buffer, Tris 10 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 50 mM y 1% de sodium dodecil sulfato). Las proteínas se digieren con proteinasa K a 37°C durante una noche, y se precipitan por la adición de NaCl 6M y centrifugación a 2500 g durante 15 minutos. El ADN se precipita añadiendo dos volúmenes de etanol 96%.

En algunos pacientes, la extracción de ADN se hizo a partir de suero usando QIAmp blood kit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis del polimorfismo de la IL-10

Los alelos presentes en las posiciones -1082 (G/A) y -592 (C/A) del promotor del gen de la IL-10 se determinaron mediante amplificación por PCR de cada una de las tres regiones polimórficas citadas, e hibridación con sondas marcadas con fluorocromos específicas para uno de los alelos de cada polimorfismo. La presencia de cada alelo polimórfico en homo o heterocigosis se determinó analizando la temperatura de *melting* de cada fragmento amplificado con las sondas específicas mediante la utilización de un termociclador a tiempo real (LighCycler).

En cada reacción de PCR se usaron 10 ng de ADN y un volumen total de 12 μL con 1,2 μL de solución tampón de PCR 10X (Taq DNA polimerasa y deoxinucleótidos trifosfato; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), MgCl_2 4 mM, 0,5 μM de cada cebador, 0,2 μM de la sonda marcada con fluoresceína (F) y 0,4 μM de la sonda conjugada con LC Red-450. Las condiciones de la PCR fueron 45 ciclos de 95°C durante 6 segundos, 63°C durante 10 segundos y 22 segundos a 72°C.

Los cebadores usados fueron: 5'-ATC CAA GAC AAC ACT ACT AAG GC y 5'-ATG GGG TGG AAG AAG TTG AA para -1082 IL-10; 5'-GGT GAG CACTAC CTG ACT AGC y 5'-GCA GCC CTT CCA TTT TACTTT C para -592 IL-10. Las sondas de hibridación (diseñadas por TIB MOLBIOL, Syntheselabor, Berlin, Alemania) fueron: GGATAG GAG GTC CCT TACTTT CCT CTT ACC-F y LC Red640-CCCTAC TTC CCC CTCCCA AA para -1082; AGC CTG GAA CAC ATC CTG TGA CCC C-F y LC Red640-CCT GTC CTG TAG GAA GCC AGT CTC para -592. El alelo presente en la posición -819

se asignó directamente debido a que presenta ligamiento total con el alelo de la posición -592 en nuestra población, como fue determinado en un trabajo previo.

Cultivos celulares

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos mediante centrifugación de las muestras en gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Noruega). Monocitos y linfocitos T fueron aislados mediante gradiente en una solución de Percoll preparada con 1,65 mL de solución salina Hank's con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 6,8 mL de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia).

Las células fueron cultivadas a una concentración de 2×10^6 células/mL a 37°C, 5% CO_2 , en medio RPMI 1640 conteniendo L-glutamina 2 mM y HEPES 25 mM (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) suplementado con 10% de FCS inactivado con calor y antibióticos, en placas de cultivo de 24 pocillos. Las células fueron activadas con PMA, dibutiril AMPc, LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y tratadas con atorvastatina (Pfizer Inc.)

Citometría de flujo

Se realizaron estudios fenotípicos de las células sanguíneas en fresco de pacientes y controles, así como de las células mononucleares cultivadas, mediante el uso de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (BD Biosciences, San José, CA), que se analizaron usando un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences).

Producción de citocinas

Las concentraciones de IL-10 presentes en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares se determinaron por ELISA. Las placas fueron recubiertas durante una noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti IL-10 (R&D Systems) y bloqueadas con caseína al 1% en TBS durante 2h a 37°C. Las muestras y estándares de IL-10 (R&D Systems) se incubaron 18h a 4°C. Tras lavado con TBS-Tween 0,05%, los pocillos se incubaron con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina durante 1h y se revelaron usando p-nitrofenol fosfato como sustrato. La absorban-

cia se determinó a una longitud de onda de 405 nm. Las concentraciones de IL-10 se calcularon a partir de la curva estándar.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes y controles se compararon con un Test chi-cuadrado (χ^2). La susceptibilidad a padecer la enfermedad, así como la presencia de autoanticuerpos específicos de LES, en función de los genotipos funcionales de la IL-10 se analizó con regresión logística, calculando odds ratios (OR) e intervalos de confianza al 95% (IC 95%). La edad de diagnóstico presenta una distribución normal (Test Kolmogorov-Smirnof), lo cual permitió su análisis mediante el Test T-Student. Los niveles de IL-10 presentes en sobrenadantes de cultivos celulares siguen una distribución normal, siendo así analizados mediante Test T-Student. Todos los cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS 11.5 (SPSS Inc.).

RESULTADOS

Polimorfismos funcionales en el promotor de la IL-10 en pacientes y controles

Diversos estudios revelan la existencia de una elevada variación en la producción de IL-10

entre individuos sanos, tanto en la secreción inducida tras la estimulación de células *in vitro* como en la producción constitutiva. En ambos casos la producción está controlada genéticamente por tres polimorfismos bialélicos localizados en las posiciones -1082(G/A), -819(C/T) y -592(C/A) del promotor de la IL-10 que dan lugar a tres haplotipos (GCC, ACC y ATA). Estudios previos muestran que individuos homocigotos para el haplotipo GCC en el promotor de la IL-10 son altos productores de IL-10, tanto basal como inducida, comparados con los individuos portadores de los haplotipos ACC o ATA en homo o heterocigosis. Estos hallazgos ponen de manifiesto la relevancia de la posición -1082 en la producción de IL-10. De esta forma, el genotipo del promotor de la IL-10 ha permitido la clasificación de los individuos en altos (-1082GG) y bajos (-1082GA o AA) productores de esta citocina.

Los alelos polimórficos presentes en las posiciones -1082, -819 y -592 del promotor génico de la IL-10 se determinaron con sondas específicas de alelo en 248 pacientes y 343 controles, lo que permitió clasificar a los individuos en genotipos altos (-1082GG) y bajos productores de IL-10 (-1082GA o AA). Se observa una mayor frecuencia del genotipo alto productor de IL-10 (-1082GG) entre los pacientes de LE que en la población sana (43,3% en pacientes vs 37,9% en controles; $p = 0,059$) (Tabla II).

TABLA II. Distribución de los genotipos del promotor de la IL-10 en individuos sanos y pacientes de LE asturianos

	Controles (n = 343)	Pacientes (n = 248)	p (test- χ^2)
-1082/-819/-592 IL-10	N (%)	N (%)	
Genotipo:			
ATA/ATA	31 (9,0)	22 (8,9)	0,944
ATA/ACC	64 (18,7)	35 (14,1)	0,144
ACC/ACC	39 (11,4)	28 (11,3)	0,976
GCC/ATA	58 (16,9)	35 (14,1)	0,357
GCC/ACC	100 (29,2)	76 (30,6)	0,696
GCC/GCC	51 (14,9)	52 (21,0)	0,054
Haplotipo:			
GCC	260 (37,9)	215 (43,3)	0,059
ACC	243 (35,3)	167 (33,7)	0,518
ATA	184 (26,8)	114 (23,0)	0,134
Alelos:			
-1082G*	37,9%	43,3%	0,059
-819T/-592A*	26,8%	23,0%	0,134

Se analizó la influencia de estos genotipos en la susceptibilidad a padecer lupus eritematoso, tanto en la variedad sistémica como en la discoide (Tabla III), encontrando asociación del genotipo alto productor de IL-10 con riesgo de desarrollar LED (26,8% en pacientes vs 14,9% en controles, OR: 2,10; IC 95%: 1,08-4,06; $p=0,029$).

Influencia de los polimorfismos de la IL-10 en la edad de diagnóstico y el sexo

El estudio de la edad media de diagnóstico en función del genotipo de la IL-10 (Tabla IV), mostró que los individuos afectados de la variedad sistémica de la enfermedad son diagnosticados a una edad más temprana que los que padecen la afectación discoide, tanto en los genotipos bajos productores de IL-10 (34,86 años vs 40,88 años; $p = 0,017$) como en los altos productores (33,84 años vs 48,93 años; $p = 0,002$). Además, se ve que la edad media de diagnóstico en LES es similar en ambos genotipos, mientras que en LED es más tardía en el genotipo alto productor de IL-10 (40,88 años vs 48,93 años; $p = 0,046$).

Cuando se analizó la edad media de diagnóstico en LES y LED respecto al sexo, se observó que la edad de diagnóstico en hombres difería en función del genotipo de la IL-10; en los individuos con LED, la edad de diagnóstico era mayor en los altos productores (64,00 años vs 43,70 años; $p = 0,004$), mientras que en los pacientes de LES, la edad de diagnóstico mayor la presentaban los bajos productores de IL-10 (47,89 años vs 23,50 años; $p = 0,042$). En el caso de las mujeres no se observan diferencias significativas en la edad de diagnóstico entre genotipos en ambas variedades de la enfermedad (Figura 1).

Polimorfismos de la IL-10 y producción de autoanticuerpos en LES

Estudiamos la posible influencia de los polimorfismos del promotor de la IL-10 en la aparición de autoanticuerpos frente a dsDNA, SSa, SSb, RNP y Sm en los pacientes afectados de forma sistémica (Figura 2). Los resultados muestran una mayor frecuencia del genotipo bajo productor de IL-10 entre los pacientes que presentan an-

TABLA III. Susceptibilidad a padecer lupus en genotipos altos productores de IL-10

			Lupus eritematoso	
	Controles	Total	LES	LED
-1082 IL-10				
AA – GA N (%)	292 (85,1)	196 (79,0)	155 (80,7)	4 (73,2)
GG N (%)	51 (14,9)	52 (21,0)	37 (19,3)	15 (26,8)
OR (IC 95%)	–	1,52 (0,99-2,33)	1,37 (0,86-2,18)	2,10 (1,08-4,06)
p		0,055	0,189	0,029

TABLA IV. Influencia del polimorfismo de la IL-10 en la edad media de diagnóstico de lupus (años)

	LED		LES	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
-1082 IL-10				
AA – GA	43,70	39,97	47,89	34,05
GG	64,00	38,89	23,50	35,09
p (test T)	0,004	0,806	0,042	0,708

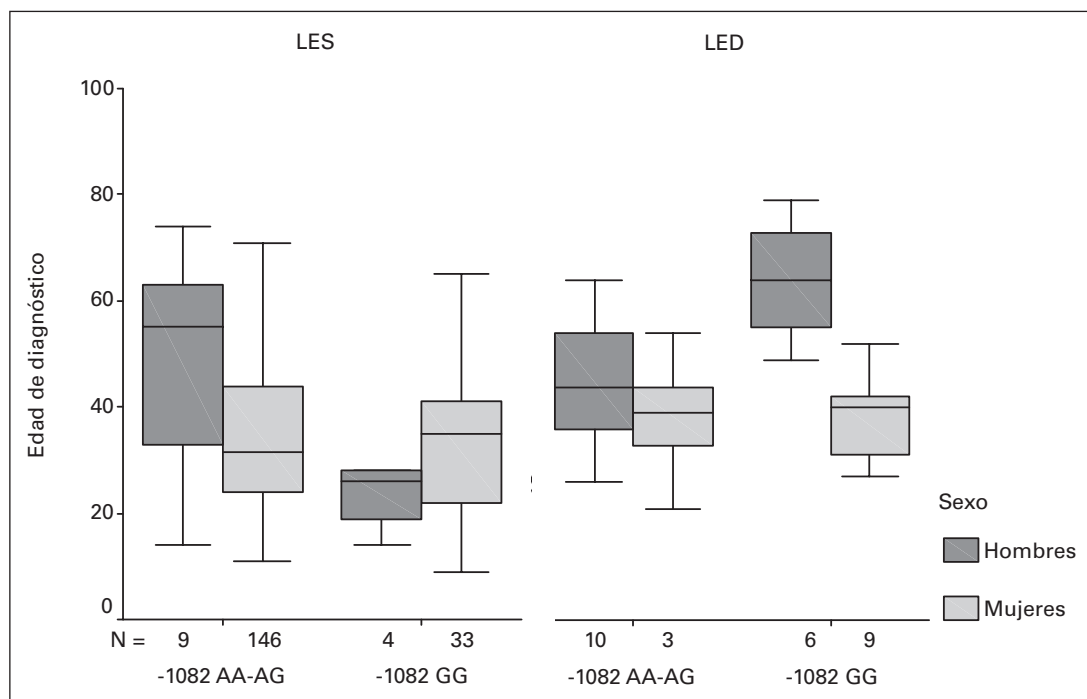


Figura 1. Diagrama de cajas representando la edad de diagnóstico de los pacientes de LED y LES en función del sexo y del genotipo de la IL-10 (-1082GA/AA: genotipo bajo productor; -1082GG: genotipo alto productor).

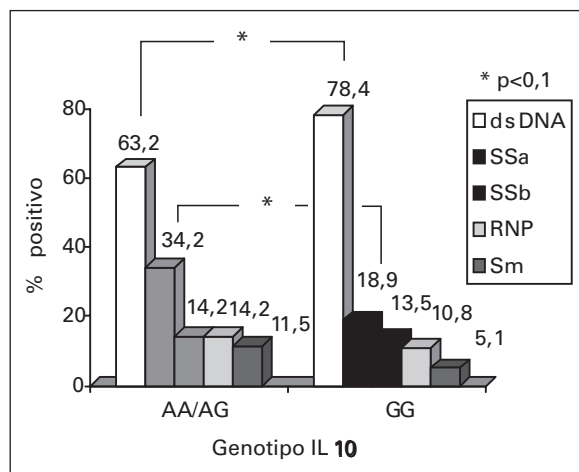


Figura 2. El histograma representa el porcentaje de pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) que presentan anticuerpos específicos dirigidos contra los antígenos: DNA nativo, SSa, SSb, RNP y Sm. Los pacientes de LES se clasificaron en bajos (-1082 GA/AA) y altos productores de IL-10 (-1082GG).

ticuerpos anti-SSa (34,2% en bajos productores vs 18,9% en altos productores; OR: 2,23; IC 95%: 0,92-5,41; $p = 0,077$), mientras que anticuerpos anti-dsDNA son más prevalentes en los pacientes de genotipo alto productor de IL-10 (78,4% vs 63,2%; OR: 2,11; IC 95%: 0,90-4,92; $p=0,085$).

Expresión de CD40L en linfocitos y monocitos de pacientes de LES y controles

Se analizó la expresión de CD40L en la superficie de linfocitos y monocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo en 76 pacientes de LES y 59 controles sanos. Observamos un valor medio de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD40L mayor en pacientes de LES que en controles, aunque las diferencias no fueron significativas; no obstante, algunos de los pacientes analizados mostraron una expresión muy elevada de dicha molécula en linfocitos T (Figura 3).

Efecto de la atorvastatina en la expresión de CD40L e IL-10

Las estatinas son fármacos usados habitualmente en el tratamiento de la hipercolesterolemia, afección común entre los pacientes de LES. Recientes estudios muestran efectos inmunosupresores de las estatinas, lo cual las convierte en un posible tratamiento en muchas enfermedades autoinmunes (13, 14).

Estudiamos el efecto de la atorvastatina en la expresión de CD40L en linfocitos cultivados in vitro durante 5h, mediante citometría de flujo.

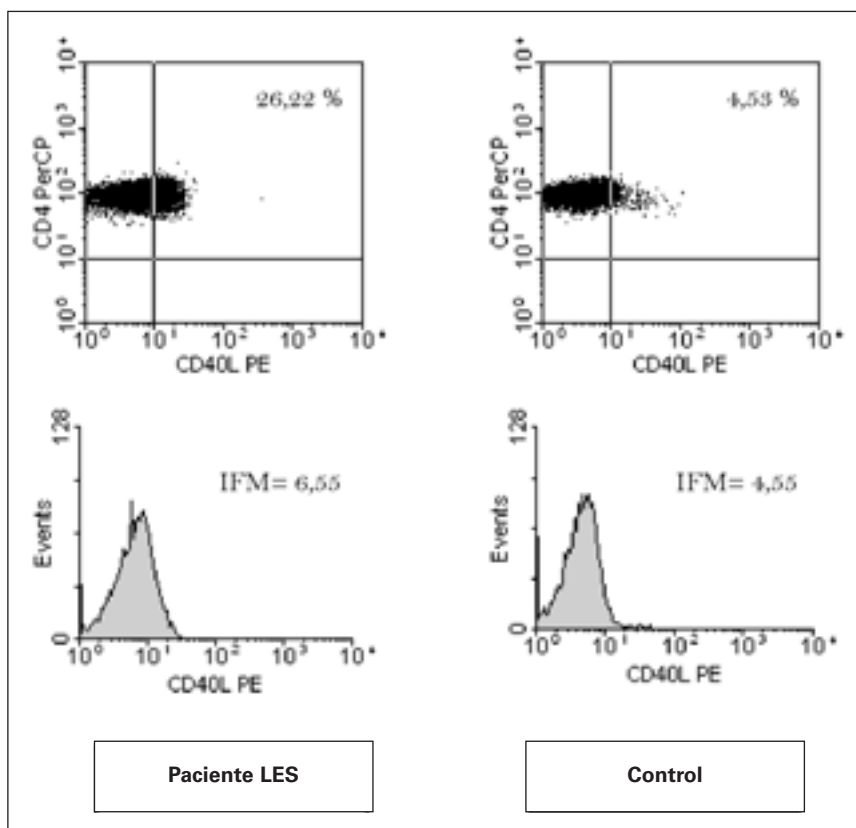


Figura 3. Dot-plots e histogramas con la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión de CD40L en linfocitos T CD4+ de un pacientes de LES y un individuo sano.

Observamos que la expresión de CD40L en linfocitos T estimulados con Ionomicina y AMPc o Ionomicina y PMA disminuye de forma dosis dependiente a partir de una concentración de atorvastatina de 5 μ M, mientras que en concentraciones menores de la misma se mantiene la expresión de CD40L. En el caso de los linfocitos B no se aprecian diferencias en la expresión de CD40L en presencia de atorvastatina (Figura 4).

Se cuantificaron, mediante ELISA, los niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivos de 48 h tanto de linfocitos T como de monocitos (Figura 5). Se observó que los niveles de IL-10 en cultivos de LT disminuían en presencia de atorvastatina a concentración 10 μ M, tanto en el caso de cultivos estimulados con Ionomicina y AMPc o Ionomicina y PMA, como en cultivos no tratados con estímulos. En el caso de los monocitos se observó disminución del nivel de IL-10 en los cultivos estimulados con LPS y atorvastatina 10 μ M respecto a los tratados con LPS únicamente; sin embargo, la atorvastatina 10 μ M no disminuyó los niveles de IL-10 producida por los monocitos de forma basal.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio hemos encontrado asociación entre polimorfismos en el promotor de la IL-10 y susceptibilidad a padecer lupus, así como con la presencia de autoanticuerpos específicos en pacientes afectados de la variedad sistémica de la enfermedad. Por otro lado, observamos una expresión incrementada de CD40L en linfocitos T CD4+ de pacientes de LES respecto a la expresión de dicha molécula en individuos sanos.

Aunque la etiología de la enfermedad es aún desconocida, existen evidencias que ponen de manifiesto la influencia de factores genéticos en el desarrollo del lupus, como la alta concordancia observada en gemelos idénticos y la mayor incidencia, tanto de la enfermedad como de ciertas alteraciones inmunológicas, entre familiares que entre la población normal (15, 16). Diversos estudios han descrito una mayor producción de IL-10 por parte de células no estimuladas procedentes de pacientes de lupus al compararlas con células procedentes de individuos sanos (17, 18).

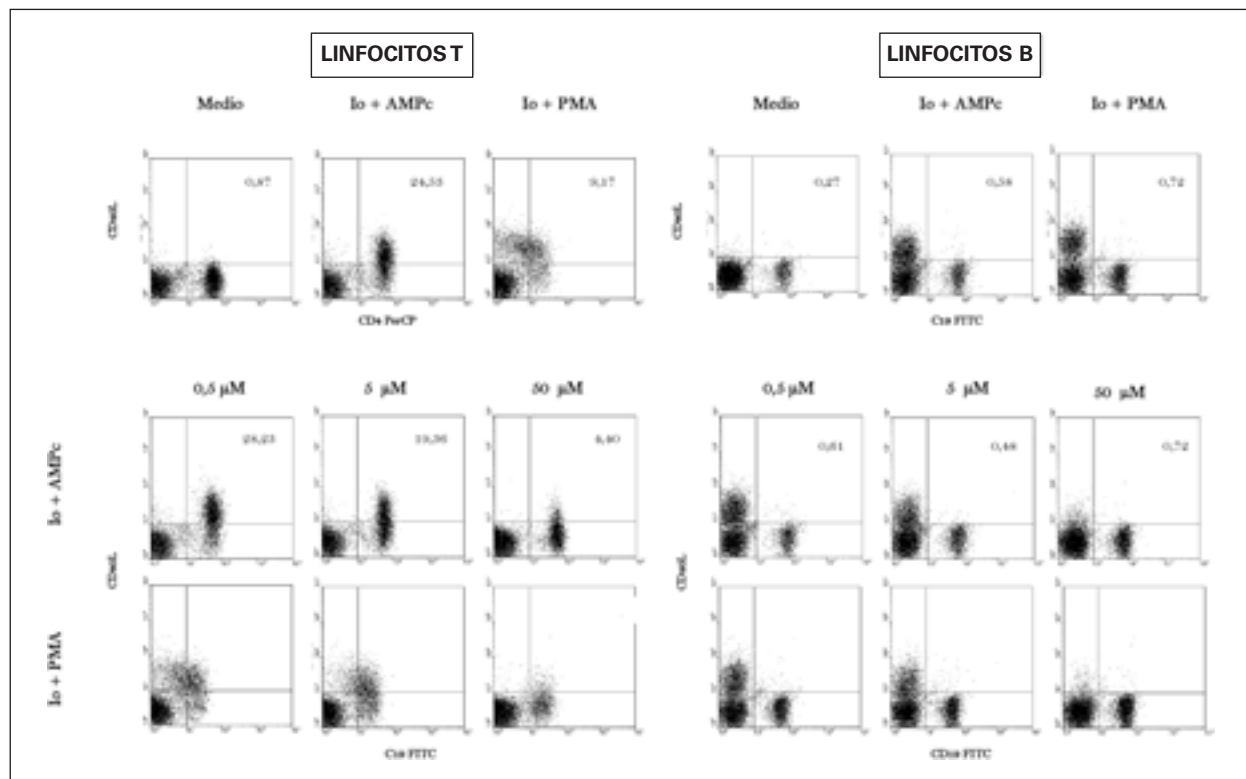


Figura 4. Dot-plots con la expresión de CD40L en linfocitos T y B, tanto no estimulados, como estimulados con Ionomicina y AMPc o PMA.

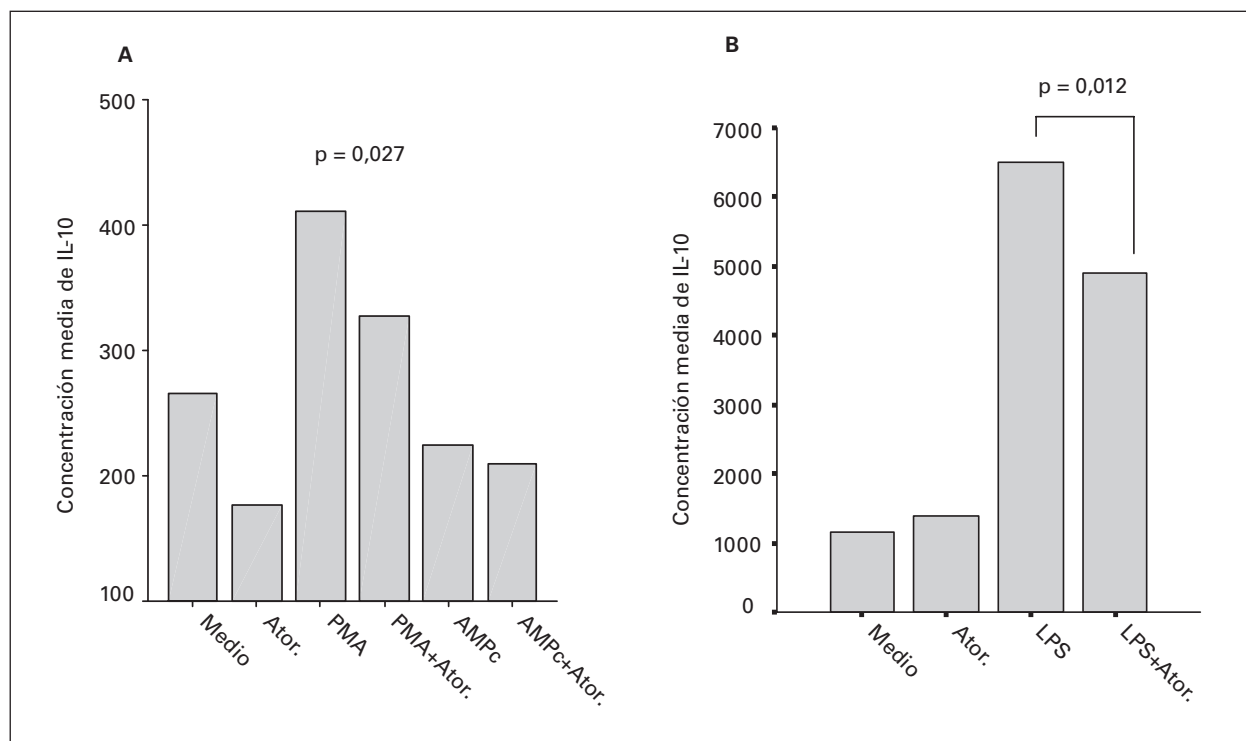


Figura 5. Niveles medios de IL-10 en linfocitos T (A) y monocitos (B) tratados con atorvastatina a una concentración final de 10 μM y estímulos (PMA, AMPc, LPS).

También se han observado niveles elevados de IL-10 en familiares sanos de pacientes afectados de LES (18). Estos datos sugieren que los niveles elevados de IL-10 hallados en pacientes de lupus son debidos probablemente a una producción basal incrementada, de manera que en este trabajo hemos analizado la influencia de esta citocina en el desarrollo de la enfermedad.

Existe una elevada variación en la producción de IL-10 entre individuos sanos, controlada genéticamente por tres polimorfismos bialélicos localizados en las posiciones -1082(G/A), -819(C/T) y -592 (C/A) del promotor génico que dan lugar a tres haplotipos (GCC, ACC y ATA) asociados a una producción de citocina variable, de manera que individuos homocigotos para el haplotipo GCC en el promotor de la IL-10 son altos productores de la misma (11, 19). Así, clasificamos a los individuos de nuestra población en altos (individuos portadores de -1082GG) y bajos (-1082GA o AA) productores de esta citocina, encontrando asociación del genotipo alto productor de IL-10 con riesgo de desarrollar LED, pero no así de LES. En la literatura encontramos resultados contradictorios acerca de la influencia de los polimorfismos de la IL-10 en el desarrollo del lupus, existiendo asociaciones del microsatélite IL-10.G con la incidencia de LES en pacientes de Escocia (20) e Italia (21) pero no de México (22, 23), Suecia (22) u otras procedencias (24). Respecto a las variaciones alélicas en las posiciones -1082, -819 y -592 del gen de la IL-10, existen estudios que encuentran correlación de dichos polimorfismos con presencia de autoanticuerpos (25) y manifestaciones clínicas (26, 27) en LES, pero no se ha descrito asociación de éstos con susceptibilidad a padecer lupus (25-27).

La asociación de una mayor producción de IL-10 con LED, no descrita hasta el momento, podría indicar un papel de la IL-10 en el desarrollo de la lesión discoide. Pese a ser la citocina inmunosupresora por excelencia de forma sistémica, ésta podría inducir inflamación cuando es sobreexpresada de forma local. Los queratinocitos son uno de los tipos celulares que producen IL-10, y esta producción se ve aumentada por la radiación UV (28), de forma que la IL-10 estimula a las células endoteliales dérmicas para secretar citocinas proinflamatorias y quimiocinas (29), pudiendo originar lesiones cutáneas. Resultan interesantes las observaciones de mejoría de manifestaciones dérmicas en pacientes lúpicos tratados con anticuerpos monoclonales anti IL-10 (30).

El análisis de la influencia del genotipo de la IL-10 en la edad de diagnóstico mostró un debut de la enfermedad más tardío en el caso de hombres con genotipo alto productor de IL-10 afectados de LED; sin embargo, este dato podría ser explicado en virtud del genotipo únicamente y no por la variedad de la enfermedad, pues se ha descrito que los individuos varones con genotipo alto productor de IL-10 presentan mayor longevidad (31).

En la población estudiada se encontró asociación no estadísticamente significativa de la presencia de anticuerpos anti-SSa con el genotipo bajo productor de IL-10, así como una mayor prevalencia de anticuerpos anti-dsDNA en los pacientes portadores del genotipo alto productor. Niveles séricos elevados de IL-10 se correlacionan con enfermedad activa y títulos altos de anticuerpos anti-dsDNA en pacientes lúpicos (6-9).

Los pacientes de LES muestran hiperactividad de los linfocitos B que origina la formación de autoanticuerpos, proceso T-dependiente que precisa la interacción CD40/CD40L. En los pacientes analizados se ha visto una expresión de CD40L mayor que en individuos sanos, principalmente en linfocitos T CD4+; esta expresión puede ser responsable de la excesiva actividad de las células B, tal y como han apuntado otros estudios (1-4).

En muchas ocasiones los pacientes de LES presentan niveles elevados de colesterol, como consecuencia del tratamiento con corticoides o de la presencia de anticuerpos dirigidos a lipoproteínas sanguíneas, motivo por el que se les administran estatinas; éstas presentan propiedades inmunomoduladoras (13, 14). Entre los efectos pleiotrópicos de las estatinas se encuentra su capacidad de inhibir la expresión de CD40L (32). En el presente estudio se observó una disminución de la expresión de CD40L de linfocitos T, tanto basal como inducida, a partir de concentraciones de atorvastatina superiores a 5 µM. Otro efecto inmunomodulador de las estatinas es su capacidad antiinflamatoria, promoviendo respuestas tipo Th2 debido a la producción de citocinas inmunosupresoras (33, 34). En los ensayos realizados, la atorvastatina 10 µM disminuía la producción de IL-10 basal e inducida por los linfocitos T, mientras que en el caso de los monocitos se observó disminución de IL-10 inducida pero no de la producida de forma basal por este tipo celular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la financiación del proyecto FICYT PG01-04, y una beca de investigación concedida por la Fundación MAPFRE Medicina en Convenio con la Universidad de Oviedo. Agradecemos la colaboración de la Asociación Lúpicos de Asturias en la ejecución del presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- HIGUCHI T, AIBA Y, NOMURA T, MATSUDA J, MOCHIDA K, SUZUKI M, KIKUTANI H, HONJO T, NISHIOKA K, TSUBATA T. Cutting Edge: ectopic expression of CD40 ligand on B cells induces lupus-like autoimmune disease. *J Immunol*. 168: 9-12. 2002
- KATSIARI C G, LIOSSIS S N, SOULIOTIS V L, DIMOPOULOS A M, MANOUSSAKIS M N, SFIKAKIS P P. Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 103: 54-62. 2002
- CROW M K, KIROU K A. Regulation of CD40 ligand expression in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2001. 28: 2644-9.
- KOSHY M, BERGER D, CROW M K. Increased Expression of CD40 Ligand on Systemic Lupus Erythematosus Lymphocytes. *J Clin Invest*. 1996. 98: 826-837
- THOMAS G N, TAM L S, TOMLINSON B, LI E K. Accelerated atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus: a review of the causes and possible prevention. *Hong Kong Med J*. 2002. 8: 26-32.
- PARKY B, LEE S K, KIM D S, LEE J, LEE C H, SONG C H. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 283-8.
- LACKI J K, LESZCZYNSKY P, KELEMEN J, MULLER W, MACKIEWICZ S H. Cytokine concentration in serum of lupus erythematosus patients: effect on acute phase response. *J Med* 1997; 28: 99-107.
- HORWITZ D A, GRAY J D, BEHRENDSEN S C, KUBIN M, RENGARAJU M, OHTSUKA K, TRINCHIERI G. Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type in patients with recent-onset lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 838-44.
- AL-JANADI M, AL-DALAAN A, AL-BALLA S, AL-HUMAIIDI M, RAZIYUDDIN S. Interleukin-10 (IL-10) secretion in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: IL-10-dependent CD4+CD45RO+ T cell-B cell antibody synthesis. *J Clin Immunol* 1996; 16: 198-207.
- TURNER D M, WILLIAMS D M, SANKARAN D, LAZARUS M, SINNOT P J, HUTCHINSON IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.
- SUÁREZ A, CASTRO P, ALONSO R, MOZO L AND GUTIÉRREZ C. Inter-individual variations on constitutive IL-10 mRNA and protein levels and its association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003; 75: 711-7.
- TAN E M, COHEN A S, FRIES J F, MASI A T, MCSHANE D J, ROTHFIELD N F, SCHALLER J G, TALAL N, WINCHESTER R J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
- MERONI P L, LUZZANA C, VENTURA D. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of statins. An additional tool for the therapeutic approach of systemic autoimmune disease? *Clin Rev Allergy Immunol* 2002; 23: 263-77.
- LEUNG B P, SATTAR N, CRILLY A, PRACH M, MCCAREY D W, PAYNE H, MADHOK R, CAMPBELL C, GRACIE J A, LIEW F Y, MCINNES I B. A novel anti-inflammatory role of simvastatin in inflammatory arthritis. *J Immunol* 2003; 170: 1524-30.
- MICEL M, JOHANET C, MEYER O, FRANCES C, WITTKE F, MICHEL C, ARFI S, TOURNIER-LASSERVE E, PIETTE J C. Familial lupus erythematosus. Clinical and immunological features of 125 multiplex families. *Medicine* 2001; 80: 153-8.
- VYSE T J, KOTZIN B L. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 261-92.
- LLORENTE L, RICHARD-PATIN Y, WIJDEENES J, ALCOCCER-VARELA J, MAILLOT M C, DURAND-GASELIN I, FOURRIER B M, GALANAUD P, EMILIE D. Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 1993; 4: 421-7.
- LLORENTE L, RICHARD-PATIN Y, COUDERC J, ALARCON-SEGOVIA D, RUIZ-SOTO R, ALCOCCER-CASTILLEJOS N, ALCOCCER-VARELA J, GRANADOS J, BAHENA S, GALANAUD P, EMILIE D. Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1429-35.
- TURNER D M, WILLIAMS D M, SANKARAN D, LAZARUS M, SINNOT P J, HUTCHINSON IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.
- ESKDALE J, WORDSWORTH P, BOWMAN S, FIELD M M GALLAGHER G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1997; 49: 635-9.
- D'ALFONSO S, RAMPI M, BOCCHIO D, COLOMBO G, SCORZA-SMERALDI R, MOMIGLIANO-RICHARDI P. Systemic lupus erythematosus candidate genes in the Italian population: evidence for a significant association with interleukin-10. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 120-8.
- ALARCON-RIQUELME M E, LINDQVIST A K, JONASSON I, JOHANNESEN B, SANDINO S, ALCOCCER-VARELA J, GRANADOS J, KRISTJANSDDOTTIR H, GRONDAL G, SVENUNGSSON E, LUNDBERG I, STEINSSON K, KLARESKOG L, STURFELT G, TRUEDSSON L, ALARCON-SEGOVIA D, GYLLENTEN U B. Genetic analysis of the contribution of IL-10 to systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999; 26: 2148-52

23. JOHANSSON C, CASTILLEJO-LOPEZ C, JOHANSSON B, SVENUNGSSON E, GUNNARSSON I, FROSTEGARD J, STURFELT G, TRUEDSSON L, LOFSTROM B, ALCOCER-VARELA J, LUNDBERG I, GYLLENSTEN U B, ALARCON-SEGOVIA D, ALARCON-RIQUELME M E. Association analysis with microsatellite and SNP markers does not support the involvement of BCL-2 in systemic lupus erythematosus in Mexican and Swedish patients and their families. *Genes Immun* 2000; 1: 380-5.
24. OU T T, TSAI W C, CHEN C J, CHANG J G, YEN J H, WANG W S, LIN CH, TSAI J J, LIU H W. Genetic analysis of interleukin-10 promoter region in patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 1998; 14: 599-606.
25. LAZARUS M, HAJEER A H, TURNER D, SINNOTT P, WORTHINGTON J, OLLIER WE, HUTCHINSON I V. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24: 2314-7.
26. ROOD M J, KEIJSERS V, VAN DER LINDEN M W, TONG T Q, BORGGREVE S E, VERWEIJ C L, BREEDVELD F C, HUIZINGATW. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus is associated with imbalance in interleukin 10 promoter haplotypes. *Ann Rheum Dis*. 1999 Feb; 58(2): 85-9.
27. MOK C C, LANCHBURY J S, CHAN DW, LAU C S. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1090-5.
28. GREWE M, GYUFKO K, KRUTMANN J. Interleukin-10 production by cultured human keratinocytes: regulation by ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 3-6.
29. SCHOLZEN T, HARTMEYER M, FASTRICH M, BRZOSKAT, BECHER E, SCHWARZT, LUGERT A. Ultraviolet light and interleukin-10 modulate expression of cytokines by transformed human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1). *J Invest Dermatol* 1998; 111: 50-6.
30. LLORENTE L, RICHAUD-PATINY, GARCIA-PADILLA C, CLARET E, JAKEZ-OCAMPO J, CARDIEL M H, ALCOCER-VARELA J, GRANGEOT-KEROS L, ALARCON-SEGOVIA D, WIJDENES J, GALANAUD P, EMILIE D. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1790-800.
31. LIO D, SCOLA L, CRIVELLO A, COLONNA-ROMANO G, CANDORE G, BONAFE M, CAVALLONE L, FRANCESCHI C, CARUSO C. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun*. 2002; 3: 30-3.
32. SCHÖNBECK U, GERDES N, VARO N, REYNOLDS R S, HORTON D B, BAVENDIEK U, ROBBIE L, GANZ P, KINLAY S, LIBBY P. Oxidized Low-Density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 2002; 106: 2888-93.
33. HAKAMADA-TAGUCHI R, UEHARA Y, KURIBAYASHI K, NUMABE A, SAITO K, NEGORO H, FUJITA T, TOYO-OKA T, KATO T. Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circ Res*. 2003 Nov 14; 93(10): 948-56. *Epub* 2003 Oct 16.
34. YOUSSEF S, STUVE O, PATARROYO J C, RUIZ P J, RADOSEVICH J L, HUR E M, BRAVO M, MITCHELL D J, SOBEL R A, STEINMAN L, ZAMVIL S S. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*. 2002 Nov 7; 420(6911): 78-84.