

11262  
1  
Tes.

**DETERMINACION DE Fas SOLUBLE EN EL SUERO DE  
PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.  
Relación con actividad de la enfermedad.**

Tesis que para obtener el título de Maestro en Ciencias Médicas por la Facultad  
de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México presenta

**Dr. Francisco Javier Aceves Avila**  
Servicio de Reumatología  
Hospital de Especialidades.  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
I.M.S.S.

Tutor :  
**Dr. Luis Javier Jara Quezada**  
Servicio de Reumatología  
Hospital de Especialidades  
Centro Médico Nacional La Raza  
I.M.S.S.

**Dr. José Moreno Rodríguez**  
Jefe de la Unidad de Investigación Médica  
en Reumatología e Inmunobiología  
Hospital de Especialidades  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
I.M.S.S.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

266420  
1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Siempre peca uno de ingrato cuando termina un trabajo. No porque la memoria sea flaca al momento de escribir esta sección se sientan ofendidos los que olvido.

Como siempre, el primer agradecimiento va para mis padres y hermanos que han sido la base de lo que soy. Al Dr. José Moreno, inagotable fuente de ideas y reconvenciones siempre oportunas. A Silvia Arzate, sin la cual mis torpes manos hubieran hecho un menjurje inútil de los costosos reactivos con los que se hizo este trabajo. Al Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI", dirigido por el Dr. Antonio Fraga, que sigo considerando mi casa y alma mater, y donde conservo a algunos de mis mejores amigos.

No por quedar al final la última, a Martha Alice, mi querida esposa, que es la que a fin de cuentas tuvo que soportar el genio que provocaron los reveses y trabas que siempre se presentan durante el proceso de investigación. Gracias por tu paciencia y cariño.

La verdad absoluta está siempre lejos de nosotros, y para servirla, lo esencial no es conocerla, sino deseirla.

Gregorio Marañón, en "Las ideas biológicas del Padre Feijóo".

El número de las hipótesis diferentes que se plantean para explicar un fenómeno biológico dado, es inversamente proporcional a los datos disponibles.

Sir Arthur Eddington.

## RESUMEN

Los anticuerpos anti-DNA de doble cadena (anti-DNA<sub>dc</sub>) son específicos del Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y se desconoce el mecanismo preciso que lleva a su producción. Fas es un receptor de superficie que media la apoptosis en linfocitos T y B a nivel periférico. En los pacientes con LES existe una forma soluble (FasS) potencialmente capaz de bloquear al ligando de Fas, lo que permitiría la permanencia y proliferación de clonas autorreactivas responsables de la producción de autoanticuerpos.

## OBJETIVO

Comparar los niveles séricos de Fas soluble (FasS) entre los pacientes con LES activo e inactivo, y buscar la correlación existente entre el FasS y los anti-DNA<sub>dc</sub>.

## MATERIAL Y METODOS

Pacientes mayores de 16 años con LES (de acuerdo a los criterios de la A.R.A. de 1982) de la Consulta externa de Reumatología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI". Sin cambios en la dosis de inmunosupresor recibido en los últimos dos meses, y con menos de 15 mg de prednisona diarios en el mismo lapso. Se les aplicó el SLEDAI (escala de medición de la actividad del LES) y previa autorización firmada del paciente se tomaron 5cc de sangre venosa. Las muestras fueron centrifugadas, se separó el suero y se congeló a -70 grados Celsius hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron procesadas al mismo tiempo. Se definió como activo un SLEDAI mayor de 2. Los niveles de FasS se midieron por medio de ELISA (Medical and Biological Laboratories Co. LTD, Nagoya, Japón). Los anticuerpos anti-DNA<sub>dc</sub> se midieron también por ELISA, con la técnica de Farr.

## ESTADISTICA EMPLEADA

Para la diferencia entre los promedios de FasS de ambos grupos se usó la prueba de t de Student. Se determinaron también los intervalos de confianza (95%) de los valores de cada grupo y de la diferencia entre ambos. Las correlaciones entre

FasS y los niveles de anti-DNA<sub>dc</sub> se determinaron con la prueba de correlación de Spearman.

Todos los valores de p expresados son a una cola.

## RESULTADOS

Se incluyeron un total de 54 pacientes. Se presentan 49 (48 mujeres, un hombre). Los restantes se excluyeron del análisis por tener incompletos sus datos. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de FasS de los pacientes con LES activo e inactivo ( $p > 0.1$ ) (activos : 3.79 ng/ml , IC 95%  $\pm 0.947$  ; inactivos : 3.05 ng/ml, IC 95%  $\pm 0.426$  : diferencia entre ambos grupos : 0.747ng/ml, IC 95%  $\pm 0.847$ ). No encontramos correlación importante entre los niveles de FasS y los de anticuerpos anti-DNA<sub>dc</sub> medidos (activos :  $r = 0.17$ ,  $p < 0.05$  ; inactivos :  $r = 0.11$ ,  $p < 0.05$  ; todos los pacientes : 0.014,  $p < 0.05$ ).

## DISCUSION

FasS no parece ser el responsable de la producción de anti-DNA<sub>dc</sub> en el LES de reactivación reciente. Al parecer, es sólo un marcador indirecto de la activación de linfocitos.

## ABSTRACT

Anti-double-stranded-DNA antibodies (anti-dsDNA) are a hallmark of systemic lupus erythematosus (SLE) and the precise mechanism leading to their production is unknown. Fas is a cell surface receptor that mediates apoptosis in peripheral T and B lymphocytes. A soluble form of Fas (FasS) can be found in SLE patients. It can block Fas ligand, which in turn would allow the permanence and proliferation of autorreactive clones responsible for the production of autoantibodies.

## OBJECTIVE

To compare the serum levels of FasS in patients with active and inactive SLE, and determine the correlation between FasS and anti-dsDNA.

## MATERIAL AND METHODS

Adult outpatients with SLE (A.R.A. 1982) from the Rheumatology clinic of the Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional "Siglo XXI". With a stable dose of immunosuppressive therapy and of steroids (<15 mg of prednisone daily) for the last two months. Activity of the disease was measured by SLEDAI. Active disease was defined as a SLEDAI >2. After signed informed consent, 5cc of venous blood were taken and stored at -70 Celsius degrees after centrifugation and serum separation. All the samples were processed at the same time. FasS was measured by ELISA (Medical and Biological Laboratories Co. LTD, Nagoya, Japan). Anti-dsDNA were measured by ELISA, using Farr's method.

## STATISTICAL ANALYSIS

The difference between means was assessed by Student's t. Confidence intervals (95%) were also determined for each group and for the difference between groups (active and inactive). The correlation between FasS and anti-DdsDNA were measured by Spearman's correlation rank. All the p values expressed are one-tailed.

## RESULTS

54 patients were included. We present 49 patients (48 women). The rest were excluded from the analysis because some of the data were missing. We found no

statistically significant differences between the mean FasS in patients with active and inactive SLE ( $p > 0.1$ ) (active SLE : 3.79 ng/ml, CI 95%  $\pm 0.947$  ; inactive SLE : 3.05 ng/ml, CI 95%  $\pm 0.426$  ; difference between groups : 0.747 ng/ml, CI 95%  $\pm 0.847$ ). We did not find important correlations between FasS levels and anti-dsDNA (active SLE :  $r = 0.17$ ,  $p < 0.05$  ; inactive SLE :  $r = 0.11$ ,  $p < 0.05$  ; all patients :  $r = 0.014$ ,  $p < 0.05$ ).

#### DISCUSSION

FasS does not seem to be responsible for the production of anti-dsDNA in recent reactivation in SLE. It seems to be an indirect marker of lymphocyte activation.

## ANTECEDENTES

Toda célula puede morir de varias maneras. Durante el desarrollo de un organismo multicelular, ocurre la muerte programada de algunas de las células que lo conforman durante los procesos de maduración de los tejidos. Esta muerte programada puede ocurrir por varios mecanismos diferentes. Uno de ellos es la apoptosis<sup>1</sup>. Esta forma de muerte celular se nombró a partir de un vocablo griego que describe la forma en que caen las hojas de un árbol o los pétalos de una flor. El término apoptosis fue seleccionado para sugerir que esta pérdida celular es deseable y necesaria para la supervivencia del organismo en que ocurre. Describe un proceso, para el que se requiere la activación de un programa celular específico, que no depende de un núcleo viable para desarrollarse, y cuyo resultado final a través de la acción de proteínas constitutivas aún no bien identificadas es la muerte de la célula en que ocurre<sup>2</sup>. No es la única forma en que puede morir una célula: a diferencia de la necrosis celular o muerte traumática, en la apoptosis se observa inicialmente una reducción del tamaño de la célula, seguida de condensación del núcleo y ruptura del DNA. La célula se fragmenta entonces en pequeños glóbulos que son fagocitados por los macrófagos habitualmente<sup>3 4</sup>.

En el sistema inmune, la apoptosis participa en forma importante en varios procesos que ocurren durante la generación de las células inmunocompetentes, así como durante las fases efectoras de la respuesta inmune. Durante su ontogenia en el timo, los precursores de los linfocitos T -timocitos- pueden sufrir apoptosis en al menos dos etapas distintas. La primera de ellas, la selección positiva, consiste en un rescate de la muerte programada de los timocitos cuyo receptor (RLT) reconoce moléculas propias de histocompatibilidad (MHC) en el timo, lo que evita que las células inútiles -con un RLT específico por otras moléculas del MHC- maduren a fases ulteriores, resultando en ahorro de energía para el organismo. En la segunda, la selección negativa, los timocitos que

reconocen moléculas del MHC con alta afinidad -supuestamente por tener péptidos propios unidos- son eliminados por apoptosis. Aparentemente, esto es relevante para prevenir la autoinmunidad <sup>5</sup> (Una revisión reciente del tema puede encontrarse en la referencia <sup>6</sup>).

La apoptosis es también importante en la regulación de la respuesta inmune normal. Después de una respuesta inmune primaria, la mayoría de los linfocitos B inicialmente estimulados por el antígeno muere por apoptosis. Esto es debido a otro proceso selectivo, en el cual sólo una pequeña fracción de los linfocitos inicialmente estimulados es la que se diferenciará en células efectoras y de memoria, debido a que por mutación somática han generado receptores -Ig de superficie- de alta afinidad por el antígeno <sup>7 8</sup>. La interacción de la Ig de superficie con el antígeno presentado por las células dendríticas foliculares en los centros germinales los rescata de la muerte programada. Finalmente, en el caso de los linfocitos T activados, se ha demostrado que su expansión es limitada asimismo por apoptosis dependiente de Fas <sup>9 10 11 12 13</sup>. Además, los linfocitos T inducen apoptosis en las células blanco como uno de sus mecanismos de citotoxicidad.

La apoptosis se encuentra regulada genéticamente, aunque no se conoce todo al respecto en los mamíferos. Por ejemplo, la sobre-expresión del proto-oncogén *bcl-2* inhibe la apoptosis iniciada por varios estímulos. En linfocitos murinos, esta sobreexpresión bloquea la mayoría de las formas de apoptosis conocidas, incluyendo la inducida por glucocorticoides, así como por irradiación. Por otro lado, la ausencia de *bcl-2* acelera la apoptosis en timo secundaria a estos estímulos. En estos mismos modelos, la maduración de linfocitos T es normal, lo que sugiere que este gen no participa en forma importante en el proceso de selección positiva de los linfocitos T en el timo <sup>14 15</sup>.

*Fas*, otro gen asociado con la apoptosis, codifica un proteína transmembranal de 45 kDa que pertenece a la familia de moléculas del receptor de factor de necrosis

tumoral (TNF) <sup>16</sup>. Estas moléculas tienen homología en sus dominios extracelulares, ricos en cisteína, y en sus dominios citoplásmicos. *Fas*, también conocido como APO-1 y CD95, es expresado en forma abundante por linfocitos T y B humanos activados. El gen que codifica *Fas* en el hombre está localizado en el cromosoma 10 (q24.1). Al activarse los linfocitos, aumenta la expresión de la molécula de *Fas* en la membrana celular<sup>17</sup>. Una vez que se expresa, su ocupación por un anticuerpo específico o por su ligando producen apoptosis <sup>18</sup>.

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria multisistémica de etiología aún no precisada. Se caracteriza por la producción de autoanticuerpos, dirigidos contra diversas proteínas y nucleoproteínas. No todos los autoanticuerpos producidos durante la enfermedad tienen un papel patogénico directo<sup>19</sup>. La morbilidad y la mortalidad propias de la enfermedad resultan del daño a los diversos tejidos que ocurre como consecuencia del proceso inflamatorio sostenido resultante del depósito de complejos inmunes formados por algunos de estos autoanticuerpos, como por ejemplo, los anticuerpos contra el DNA de doble cadena, que activan diversos sistemas inflamatorios.

En el LES, como en otras enfermedades autoinmunes, se ha propuesto que el defecto en la tolerancia a lo propio podría deberse a la falta de eliminación de linfocitos autorreactivos, ya sea a nivel central -delección clonal- y/o periférico <sup>20</sup>.

En modelos animales, se ha demostrado que defectos en la expresión de *Fas*, del ligando de *Fas* (*FasL*) y/o de *bcl-2* pueden desencadenar fenómenos autoinmunes similares a los que ocurren en el LES. El papel de la apoptosis mediada por *Fas* ha sido estudiada en un modelo experimental del LES, el ratón MRL. La enfermedad autoinmune que se presenta en el ratón MRL es determinada genéticamente por mecanismos aún no bien establecidos. La autoinmunidad en dichos animales es leve, a menos que sea acelerada por la

presencia del gen *lpr*, de manera que el ratón MRL *lpr/lpr* desarrolla una enfermedad autoinmune multisistémica grave y de rápida evolución similar al LES humano. El producto del gen *lpr* corresponde a una mutación en el gen de *Fas*, consistente en una inserción en el segundo intrón que resulta en una terminación prematura de la transcripción<sup>19 21</sup>. De acuerdo a este modelo, se ha demostrado que *Fas* participa en la deleción periférica de linfocitos T, no en la que ocurre en timo. También se encuentra intacta la selección negativa de linfocitos B autorreactivos<sup>22</sup>. Por otro lado, en la mutación *gld*, con una expresión similar a *lpr* en cuanto a fenómenos autoinmunes, la mutación ocurre en el gen que codifica *FasL*<sup>10</sup>. Así mismo, la sobreexpresión de *bcl-2* induce fenómenos autoinmunes similares al LES en el ratón<sup>23</sup>.

A pesar de todos estos datos que sugieren que las alteraciones en el proceso de apoptosis en los linfocitos parecen estar relacionadas con el inicio y el mantenimiento de las enfermedades autoinmunes, en el humano no se han encontrado mutaciones en los genes ni disminución en la expresión de *Fas in vitro* en linfocitos T y B de pacientes con LES<sup>24 25</sup>. De hecho, los linfocitos T de pacientes con LES activo expresan más abundantemente *Fas* y *bcl-2* que los pacientes inactivos y que los sujetos sanos<sup>16 17</sup>, quizá como marcadores de activación celular. También se ha demostrado que el *Fas* expresado por estos linfocitos es funcional; es decir, que una vez que es ocupado por un anticuerpo específico induce apoptosis.

Cheng y cols. encontraron que existen en el hombre dos formas distintas de *Fas*, resultantes del procesamiento alterno de su RNA mensajero. Una que codifica la forma unida a membrana, y otra cuyo producto se expresa como una forma secretada (*Fas soluble*), resultantes de una duplicación del gen de *Fas*. A la segunda le llamaron *FasΔTM*, y tiene una deleción de 63 pares de bases, lo que hace que a su producto final le falten 21 aminoácidos; cinco de ellos son los últimos del dominio extracelular de *Fas*, y los otros son 16 de los 17 aminoácidos

del dominio hidrofóbico transmembranal de *Fas*<sup>26</sup>. De acuerdo a estos autores, en sujetos normales y en pacientes con artritis reumatoide, esta forma soluble de *Fas* se encuentra en concentraciones menores de 100 ng/ml en suero, mientras que en 60% de los pacientes con LES se encuentra por arriba de estos niveles<sup>16</sup>. Esta forma soluble de *Fas* es capaz de unirse y bloquear a *FasL in vitro*, y por lo tanto, puede prevenir la apoptosis en las células que expresan *Fas* en su membrana.

Los mismos autores han propuesto que en los pacientes con LES la apoptosis puede estar disminuida debido a la producción aumentada de *Fas* soluble<sup>11</sup>, lo que en teoría bloquearía *FasL*. Lo anterior podría alterar el estado de tolerancia inmunológica en forma similar a lo que ocurre en los modelos murinos *lpr* y *gld*, acelerando el proceso autoinmune en los pacientes con LES, y explicaría el mecanismo de producción de los brotes de actividad de la enfermedad. Sin embargo, hasta ahora no se sabe si existe o no una diferencia entre las cantidades presentes en el suero de pacientes con LES activo e inactivo.

Los anticuerpos anti-DNA de doble cadena (anti-DNA<sub>dc</sub>) se encuentran en casi un 90% de los pacientes con LES. Son uno de los marcadores serológicos más específicos para la enfermedad. El encontrarlos a títulos elevados es prácticamente diagnóstico de la enfermedad. En sujetos normales también se pueden encontrar títulos bajos de anticuerpos anti-DNA, con la diferencia de que los anticuerpos presentes en pacientes con LES son dirigidos contra el DNA de doble cadena, mientras que los anticuerpos anti-DNA que pueden encontrarse en sujetos normales son de cadena sencilla. Además de estar dirigidos contra el DNA<sub>dc</sub>, los anticuerpos producidos en el LES son de alta afinidad por el mismo, lo que sugiere que para la maduración del anticuerpo fue necesaria la participación de linfocitos T capaces de identificarlo, en vez de una activación inespecífica de los linfocitos B<sup>27</sup>.

La medición seriada de los niveles séricos de anticuerpos anti-DNAc por la técnica de Farr son un método sensible para predecir las exacerbaciones de la enfermedad en el LES; actualmente es el estudio de elección para el seguimiento, especialmente cuando existe afección a nivel renal <sup>28</sup>. Cuando menos en modelos animales, parece ser que la persistencia de la reactividad contra el DNA puede deberse a fallas en la eliminación de linfocitos autorreactivos, aunque no ha podido demostrarse en todos los casos una falla en la apoptosis de linfocitos autorreactivos <sup>29</sup>. Los anticuerpos antinucleares también se elevan con la actividad de la enfermedad y tienden a abatir sus niveles cuando la enfermedad se encuentra clínicamente silente.

En modelos murinos portadores de la mutación *lpr/lpr*, no se encuentra afectada la apoptosis de linfocitos B <sup>30</sup>. Sin embargo, sí existen en ellos linfocitos B autorreactivos. Al inicio de las manifestaciones autoinmunes, a las 6 a 8 semanas de edad, estos ratones presentan una activación policlonal de linfocitos B, con anticuerpos dirigidos contra una gran cantidad de antígenos, sin gran afinidad por ninguno de ellos. Cuando los ratones maduran, entre las 12 y 38 semanas de edad, ya existe un sesgo en el repertorio de anticuerpos presentes en ellos. Hay un aumento desproporcionado de linfocitos B productores de anticuerpos específicos del LES, como son anticuerpos anti-Sm y anti-DNA <sup>31</sup>. Para explicar la producción tardía de autoanticuerpos, se ha sugerido la persistencia de clonas autorreactivas de linfocitos T, dejando a la activación policlonal inicial como una alteración permisiva, capaz de potenciar su expresión <sup>21</sup>. Una explicación posible para esto es la aparición de linfocitos T autorreactivos como consecuencia de las alteraciones en la apoptosis provocada por esta mutación. Estos linfocitos T autorreactivos, una vez activados, pueden ayudar a los linfocitos B autorreactivos a resistir la inducción de tolerancia durante su maduración <sup>19 20</sup>.

Si esto es así, esperaríamos una cercana correlación entre las cifras de autoanticuerpos con el *FasS* en el suero de pacientes con LES. Tanto los título de

autoanticuerpos como los de *FasS* aumentarían en forma paralela al activarse la enfermedad, y disminuirían también en forma paralela al disminuir la actividad de la misma.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al parecer, un defecto en la apoptosis de los linfocitos podría ser un factor contribuyente al desarrollo de enfermedades autoinmunes. En el caso del LES, este defecto resultaría en el inicio y persistencia de un episodio de autoinmunidad como los que caracterizan a la enfermedad, de los que no sabemos con certeza ni qué los inicia, ni qué los lleva a su fin.

Sabemos asimismo que los linfocitos T activados mueren por apoptosis una vez que la molécula *Fas* en su superficie es ocupada por su ligando, presente en los mismos linfocitos y en otros tipos celulares. Conocemos también la existencia de una forma soluble de *Fas*, que de acuerdo a algunos autores se encuentra en la mayoría de los pacientes con LES por arriba de las cifras encontradas en sujetos normales, aunque no se sabe si este subgrupo con *Fas* soluble elevado representa o no a los pacientes activos. La forma soluble de *Fas* es capaz de inhibir la apoptosis inducida *in vitro*, al evitar que el *FasL* se una a *Fas*, ya que *FasL* es ocupado por la forma soluble de *Fas*. Este puede ser un mecanismo que explique la persistencia de células autorreactivas viables en la periferia y por lo tanto los episodios de actividad en LES.

Una consecuencia verificable de este marco teórico sería el encontrar una diferencia entre las cantidades medibles de *Fas* soluble entre los pacientes activos y los pacientes inactivos con LES.

Una segunda consecuencia verificable en este marco teórico sería la variación conjunta de las cifras medibles en suero de autoanticuerpos propios del LES, cuya producción en los linfocitos B es ayudada y dirigida por linfocitos T que no son eliminados por los mecanismos habituales de control de los linfocitos autorreactivos, y las de *Fas* soluble, que sería la causa por la que estos linfocitos autorreactivos persisten viables.

## HIPOTESIS

1.-El promedio del título de *Fas* soluble medible en suero de pacientes con LES activo es mayor que el promedio del título de *Fas* soluble medible en suero de pacientes con LES inactivo.

2.-En pacientes con LES, existe una correlación positiva entre el título de *Fas* soluble y el título de anticuerpos antinucleares y anti-DNA<sub>dc</sub> medibles en suero.

## OBJETIVOS

- 1) Comparar el promedio entre el título medible de *Fas* soluble en suero de los pacientes con LES activo e inactivo.
- 2) Medir la correlación existente entre las cantidades medibles de *Fas* soluble y de anticuerpos anti-DNA<sub>dc</sub> en pacientes con LES.

## CRITERIOS DE INCLUSION

- 1) Pacientes mayores de 16 años de edad.
- 2) Que cumplan con los criterios establecidos por la A.R.A. para LES en 1982 (26).
- 3) Dosis fija de prednisona menor de 15 mg diarios en las últimas cuatro semanas.
- 4) En caso de consumir algún inmunosupresor, tener una dosis fija del mismo en los últimos dos meses.
- 5) Firma de la carta de consentimiento informado.

## CRITERIOS DE NO INCLUSION

- 1) Proceso infeccioso intercurrente.
- 2) Inmunización en los últimos tres meses.
- 3) Transfusión de productos de la sangre o de sangre total en los últimos 3 meses.
- 4) Haber sido sometido a hemodiálisis o a plasmaféresis en los últimos 6 meses.
- 5) Presencia de otra enfermedad reumática sistémica.

## MATERIAL Y METODOS

Se tomaron pacientes de la consulta externa del Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del I.M.S.S. que cumplieron con los criterios de clasificación para el LES de la American Rheumatism Association (1982) <sup>26</sup>. Se les aplicó el SLE-DAI, que es un cuestionario que permite discernir entre los pacientes activos e inactivos con LES <sup>32</sup>. Se se encuentra validado en nuestro idioma y nuestro medio. Todo paciente con un SLEDAI mayor de 2 fue considerado activo. Se explicó al paciente la naturaleza del trabajo, y previa firma de una carta de autorización se tomaron cinco centímetros de sangre venosa periférica. Posteriormente se centrifugó esta muestra para separar el suero y éste se congeló a -70 grados Celsius. Todas las muestras fueron procesadas al mismo tiempo.

Los niveles de FasS fueron determinados por medio de una prueba comercial de ELISA (sandwich) (Medical and Biological Laboratories Co. LTD, Nagoya, Japón). En breve, en los pozos cubiertos con anticuerpos policlonales contra Fas se agregan y se incuban por 60 minutos los sueros problema (100 µl) y los estándares proporcionados por el fabricante. Todo a temperatura ambiente (menor de 25 grados centígrados en la fecha en que se realizó el procedimiento). Luego de lavarlos, se agrega un anticuerpo monoclonal contra Fas conjugado con peroxidasa (100µl) y se incuba. Después de otro lavado, el sustrato de peroxidasa se mezcla con el cromógeno y se deja incubando nuevamente. Al término, se agrega una solución ácida a cada pozo (100 µl) para detener la reacción enzimática y para estabilizar el color adquirido. La densidad óptica de cada pozo es entonces medida a 450 nm usando un lector apropiado. La concentración de FasS de cada suero problema es entonces calculada con base en una curva dosis-respuesta obtenida con las soluciones estándar de

referencia proporcionadas por el fabricante. Se incluyeron al azar doce sueros repetidos, y la lectura fue idéntica para las mediciones pareadas, lo que asegura la reproducibilidad de la prueba utilizada.

#### ESTADISTICA EMPLEADA

Para la diferencia entre los promedios de Fas soluble entre los grupos de pacientes activos e inactivos se empleó la prueba de t de Student. Se determinaron asimismo los intervalos de confianza (95%) de los valores obtenidos para cada grupo, y de la diferencia entre ambos.

Para las correlaciones entre Fas soluble y los autoanticuerpos en el suero de los pacientes, ambos fueron considerados como variables ordinales y se empleó la prueba de correlación de Spearman.

Todos los valores de p expresados son a una cola.

## RESULTADOS

Se incluyó a un total de 54 pacientes, de los cuales se presentan 49 (48 mujeres, un hombre). Los cinco restantes no fueron incluidos en el análisis final por tenerse incompletos los datos demográficos o los correspondientes a la medición de la actividad clínica de la enfermedad al momento de la toma de la muestra.

Un total de nueve pacientes tenían actividad clínica del LES de acuerdo al punto de corte definido previamente para el SLEDAI. La edad de ambos grupos de pacientes fue similar, sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1).

No hubo diferencias significativas entre la cantidad detectada de Fas soluble entre ambos grupos (activos e inactivos). Ambos grupos presentan cantidades elevadas de la molécula de Fas soluble de acuerdo al punto de corte (2 ng/ml) propuesto como normal por Mountz y cols<sup>33</sup>. El grupo de activos presentó un promedio de 3.79 ng/ml (IC 95%  $\pm$  0.947), mientras que el de inactivos presentó un promedio de 3.05 ng/ml (IC 95%  $\pm$  0.426). Esto puede verse en la figura 1. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos: la prueba de Student no pudo rechazar la hipótesis nula ( $p > 0.1$ ). La diferencia entre los promedios de ambos grupos fue de 0.747 (IC 95%  $\pm$  0.847).

Para investigar si a pesar de no ser diferentes los grupos en las cantidades de Fas soluble detectadas, existía tendencia a que cifras mayores se observaran con la actividad de la enfermedad, de acuerdo con la hipótesis en la cual se basó este trabajo, se midió la correlación entre la actividad/inactividad de la enfermedad y las cantidades medidas de Fas S. No hubo correlación importante entre estas variables ( $r_{pb} = 0.16$ ,  $p = 0.15$ , una cola).

Habíamos propuesto asimismo la posibilidad de que correlacionaran cifras altas de Fas soluble con la presencia simultánea de autoanticuerpos característicos de

la enfermedad. Para ello, se midió la correlación existente entre las cantidades séricas de Fas soluble y los títulos de anticuerpos antinucleares encontrados en el mismo paciente. Tampoco hubo una buena correlación entre ellos ( $r_s = 0.17$ ,  $p > .05$ , una cola). Dado que los títulos de anticuerpos antinucleares se expresan como variable ordinal, abarcando sólo seis opciones posibles, hubo de corregirse la correlación inicialmente encontrada de acuerdo al método propuesto por Siegel<sup>34</sup>.

La correlación entre los anticuerpos anti-DNA<sub>dc</sub> y las cifras de Fas soluble tampoco fue importante. Se midió la correlación entre las cifras de FasS encontradas en todos los pacientes. Sin separar entre activos e inactivos, la correlación obtenida fue baja ( $r = 0.014$ ,  $p < 0.05$  a dos colas). Esto puede verse en la figura 2. En la figura 3 y 4 pueden verse a los pacientes separados en activos e inactivos, de acuerdo a la calificación del SLEDAI obtenida al momento de la toma de la muestra. Hubo una discreta tendencia a encontrar mejor correlación entre las cifras de anti-DNA de doble cadena y los niveles medidos de FasS entre los pacientes con LES activo que entre los de LES inactivo. En los pacientes con actividad de la enfermedad, encontramos una correlación de 0.17 ( $p < 0.05$  a una cola) mientras que ésta fue de 0.11 en los inactivos ( $p < 0.05$  a una cola). Sin embargo, en ninguno de los casos la variación de las cifras de FasS explica la variación en las cifras de anti-DNA de doble cadena, lo que sugiere que aunque se correlacionan en las gráficas, la producción de uno no depende linealmente del otro ( $r^2 = 0.03$  en los pacientes activos). Probablemente esto se deba a que ambas moléculas son medidores indirectos de activación de linfocitos y sea este el motivo de la discreta correlación encontrada.

## DISCUSION

En el presente estudio no encontramos diferencias entre las cantidades medibles de Fas soluble en el suero de dos grupos de pacientes con LES; uno de pacientes con la enfermedad activa y otro con la enfermedad inactiva. Tampoco encontramos ninguna correlación importante entre las cantidades de Fas soluble en el suero de los pacientes y la actividad de la enfermedad, medida por SLEDAI, ni con los títulos de anticuerpos anti-DNA<sub>dc</sub> o anticuerpos antinucleares.

Una enfermedad como el LES, en que el daño por mecanismos autoinmunes se presenta en brotes episódicos, con exacerbaciones espontáneas y no predecibles caracterizadas por la elevación de títulos de autoanticuerpos, algunos de ellos ya demostrados como patogénicos, sugiere fuertemente la persistencia de linfocitos autorreactivos (T y B), dado que se sabe que los autoanticuerpos característicos de la enfermedad dependen para su formación de la cooperación *in vivo* de ellos<sup>35</sup>.

Dado que los títulos de autoanticuerpos habitualmente disminuyen hasta su completa desaparición cuando la enfermedad se encuentra inactiva clínicamente, independientemente de la causa de esta inactividad (espontánea o inducida por tratamiento con inmunosupresores), y que vuelven a elevarse cuando se presenta un nuevo brote de actividad, con un patrón de respuesta conservado en cada paciente particular, la persistencia de clones de linfocitos autorreactivos es evidente, y debe existir un mecanismo, aún no precisado, que permita la supervivencia y nueva proliferación de linfocitos autorreactivos que acompaña a los brotes de actividad de la enfermedad<sup>36</sup>. La molécula de Fas soluble es un atractivo candidato que permitiría la supervivencia de linfocitos circulantes al bloquear la unión de Fas con su ligando, evitando así la deleción periférica de linfocitos autorreactivos.

Sin embargo, a pesar de lo atractivo de la hipótesis, no encontramos diferencias importantes entre las cantidades de Fas soluble en el suero de pacientes activos

e inactivos (Figura 1). Los pacientes activos (n=9) tuvieron una cantidad promedio de Fas soluble de 3.796 ng/ml con un intervalo de confianza (95%) de  $\pm 0.947$  ng/ml, mientras que las cantidades correspondientes a los inactivos (n=40) fueron de 3.049 ng/ml con un intervalo de confianza (95%) de  $\pm 0.426$  ng/ml. Ambas cantidades son muy similares: de acuerdo a nuestros resultados, el haber obtenido en esta ocasión una cifra discretamente mayor de Fas soluble en los pacientes activos fue debido al azar, y si esta prueba se repitiera en poblaciones similares en varias ocasiones, no tendríamos siempre cifras mayores en el grupo de activos que en el de inactivos. Esto se ve más claramente al determinar el intervalo de confianza (95%) de la diferencia entre los promedios:  $0.747$  ng/ml  $\pm 0.847$  ng/ml. Esto es, con un 95% de certeza, el valor real de la diferencia está entre  $-0.1$  ng/ml y  $1.694$  ng/ml. Aunque tiende a ser mayor en los pacientes activos, esto no es la regla. El valor real de la diferencia está en algún lugar entre estas dos cifras, y no se puede descartar que el valor real de la diferencia sea cero.

Fas es miembro de la familia del TNF, y algunos de los productos de este grupo disminuyen su producción como efecto de algunos medicamentos, incluyendo los esteroides y algunos otros fármacos empleados en el manejo de pacientes con LES. No hubo diferencia en los fármacos que recibían los pacientes de ambos grupos al momento de la toma de la muestra. Todos ellos tenían dosis fijas de medicamentos, y no se habían modificado en los tres meses previos a la obtención de las muestras de suero. Por ello, es poco probable que la pequeña diferencia encontrada se explique por abatimiento en la producción de Fas soluble por un aumento en el consumo de fármacos (v.gr. esteroides) capaces de disminuir la producción de otras moléculas de la misma familia de Fas.

La calificación del SLEDAI en nuestros pacientes activos tuvo una variación entre 2 y 10, lo que se considera una actividad clínica moderada de la enfermedad. Con base en nuestra muestra de pacientes, no podemos predecir con certeza los

valores reales de Fas soluble que pudieran encontrarse en el suero de pacientes con SLEDAI mayor de 10, o sea, con una gran actividad clínica de la enfermedad. Queda la posibilidad de que los pacientes con LES con grados severos de actividad clínica (SLEDAI >10) sean los que expliquen diferencias tan marcadas en las cantidades de Fas soluble como las reportadas por Cheng y cols y las que encontramos. Otros autores no han encontrado tampoco correlación entre calificaciones del SLEDAI similares a las que aquí reportamos y aún mayores y los niveles de Fas soluble elevado <sup>37</sup>, <sup>38</sup>. Estos mismos autores reportan cantidades de Fas soluble similares a las que presentamos.

Hay una gran discrepancia entre los valores (en ng/dl) que se han reportado de Fas soluble en los sueros de pacientes con LES. Cheng y cols. hablaban de valores mayores de 100 ng/dl en su reporte original, hallazgo que no ha sido repetido por ninguno de los reportes posteriores, incluido uno en el que el mismo Cheng y sus colaboradores participaron <sup>39</sup>. Hasta ahora, no se ha ofrecido hasta ahora ninguna explicación para esta discrepancia. El ELISA que nosotros utilizamos está basado en el método original reportado por Cheng y cols. , por lo que serían de esperarse cifras similares de FasS.

Para intentar explicar esta marcada diferencia hay varias posibles explicaciones a tomar en cuenta. Con respecto a los resultados de nuestro trabajo, podría deberse al diverso origen étnico de los pacientes incluidos. Nuestros pacientes son todos mestizos mexicanos, y aunque no se describen los grupos étnicos a que pertenecen los pacientes incluidos en los diversos reportes, la similitud de las cifras encontradas en poblaciones similares a la del estudio de Cheng (pacientes estadounidenses) y entre países diferentes (México y E.U.) hacen esta explicación improbable.

Independientemente de la actividad clínica del LES, medida por la calificación del SLEDAI, buscamos la correlación existente entre las cantidades detectables en

suero de varios autoanticuerpos característicos de la enfermedad y las cantidades de Fas soluble. Los autoanticuerpos encontrados en los pacientes con LES son producto de una respuesta inmune madura, en la que previamente hubo de existir el reconocimiento del autoantígeno por un linfocito B y un linfocito T, y ambos debieron cooperar entre sí por un tiempo suficiente como para permitir la proliferación de ambos y la maduración de la respuesta de anticuerpos, esto es, el paso de la producción de anticuerpos IgM (respuesta inicial) a IgG (respuesta madura). Para ello, suponemos que debe existir un mecanismo que evite la eliminación de estos linfocitos autorreactivos, y la molécula de Fas soluble es un candidato natural para cumplir esta función. Sin embargo, contra lo que esperábamos, ni los títulos de anti-DNA de doble cadena ni los títulos de anticuerpos anti-nucleares correlacionaron con las cantidades de Fas soluble encontradas. Goel y cols. tampoco encontraron correlación importante entre el Fas soluble y las cifras de anti-DNA de doble cadena y otros marcadores serológicos de actividad en su grupo de once pacientes con LES. Respecto a la correlación entre FasS y los títulos de anti-DNA de doble cadena, que hasta ahora son el medidor más fiel de actividad de la enfermedad, hubo una discreta tendencia a la correlación positiva (Figuras 2, 3 y 4). Sin embargo, al parecer la discreta tendencia a la elevación conjunta, aunque estadísticamente significativa, no representa la dependencia de una sobre la otra. Es decir, los niveles de anticuerpos anti-DNA de doble cadena no dependen de niveles altos de FasS para estar presentes, y su descenso tampoco es explicado por la ausencia o bajos niveles de FasS. Esto puede verse con los valores de  $r^2$ , que describen la dependencia entre variables. En los pacientes activos, el valor de  $r^2$  fue de 0.03, y en los inactivos fue de 0.01, en el total de los pacientes fue de 0.0002. Esto quiere decir que en los pacientes activos, sólo 3% de la variación de las cifras de anti-DNA de doble cadena es explicada por la elevación de las cifras de FasS, en los pacientes con LES inactivo FasS sólo explica el 1% de la variación, y en el total de pacientes explica el 0.02%. Esto sugiere que ambas moléculas se elevan

aunque en proporciones diferentes por una causa o causas comunes. Creemos que FasS está actuando como un indicador indirecto de la activación de linfocitos.

La mutación del gen que codifica Fas en el humano es rara. Hay casos bien estudiados de delección genómica homocigota del gen de Fas, que se traduce por ausencia completa de Fas en los tejidos, y de mutaciones heterocigotas, en donde la función de la molécula es, a lo más, defectuosa <sup>40 41</sup>. También se ha reportado cuando menos un caso de mutación en el gen que codifica el ligando de Fas en un hombre con LES, en el que la enfermedad fue de inicio tardío (después de los 50 años de edad) <sup>42</sup>, por lo que la dependencia causal entre la mutación y la aparición de la enfermedad autoinmune es dudosa.

Tanto la ausencia completa como la falla en la expresión de Fas en el humano se traducen por fenómenos autoinmunes bien definidos, que tienen un cierto parecido con los modelos murinos de LES en cuanto a su expresión clínica, pero que difieren grandemente del LES humano, tanto por su expresión de autoanticuerpos como por el tipo de linfocitos circulantes.

Se caracterizan por la presencia de anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia e infecciones asociadas tanto a neutropenia como a la esplenectomía que generalmente se realiza para el manejo de las otras citopenias mencionadas. También se presenta linfoproliferación, pero ésta tiene la llamativa característica de ser fluctuante en forma espontánea, lo que sugiere la actividad de mecanismos alternos que regulan la apoptosis de linfocitos T a nivel periférico. En estos pacientes no hay habitualmente expresión de anticuerpos antinucleares o anticuerpos anti-DNAc.

No se ha explicado hasta ahora la función de Fas en los otros tejidos en que su expresión es habitual, como ovario, corazón e hígado. En los casos descritos de ausencia total de la expresión de Fas no se han encontrado alteraciones ni en la función ni en el desarrollo de estos órganos. Su función en ellos, si es que tiene alguna, permanece oscura.

Aunque de acuerdo a nuestros resultados y los de otros autores la molécula de Fas soluble no parece tener un papel importante en el mantenimiento de los brotes de actividad clínica del LES, quedan aún por explorar en relación con ella algunas posibilidades interesantes.

Hasta ahora no existen estudios prospectivos en que la medición seriada de Fas soluble permita definir si se eleva antes de que se exprese la actividad clínica de la enfermedad, con un probable abatimiento posterior una vez que la respuesta autoinmune ya se encuentra montada. Dado que los estudios citados hasta ahora (incluyendo el trabajo actual) han sido mediciones únicas de la molécula en suero, es decir, transversales en el tiempo, cabe la posibilidad de que estemos midiendo la fase final de la elevación de Fas soluble, cuando los niveles de la molécula tienden ya a regresar a sus niveles basales en los pacientes con LES. No se puede determinar aún cuanto tiempo antes del inicio de un brote de actividad clínica de la enfermedad existe la actividad autoinmune que lo produce, pero la elevación de los autoanticuerpos característicos de la enfermedad habitualmente precede a la expresión clínica de los brotes de actividad. En el caso específico de los anticuerpos anti-DNA de doble cadena y la actividad renal en el LES, la elevación de los anticuerpos puede preceder hasta en tres meses el inicio de la expresión clínica del daño renal. La evidencia que demuestra la supervivencia prolongada y/o la proliferación excesiva de linfocitos T en pacientes con LES y la asociación entre el número de linfocitos T activados y el de linfocitos B productores de anticuerpos en pacientes con LES activo sugieren la existencia de un factor que prolonga la vida de linfocitos T activados (probablemente autorreactivos) y favorece la cooperación de éstos con linfocitos B productores de autoanticuerpos, generando así un brote de actividad. La participación del Fas soluble en este papel aún no ha sido descartada. Sin embargo, será difícil definir cual es el papel de la molécula de Fas soluble en ello mientras no conozcamos completamente cómo es regulada a su vez su producción y su acción, pues ya se ha reportado también una forma soluble del ligando de Fas.

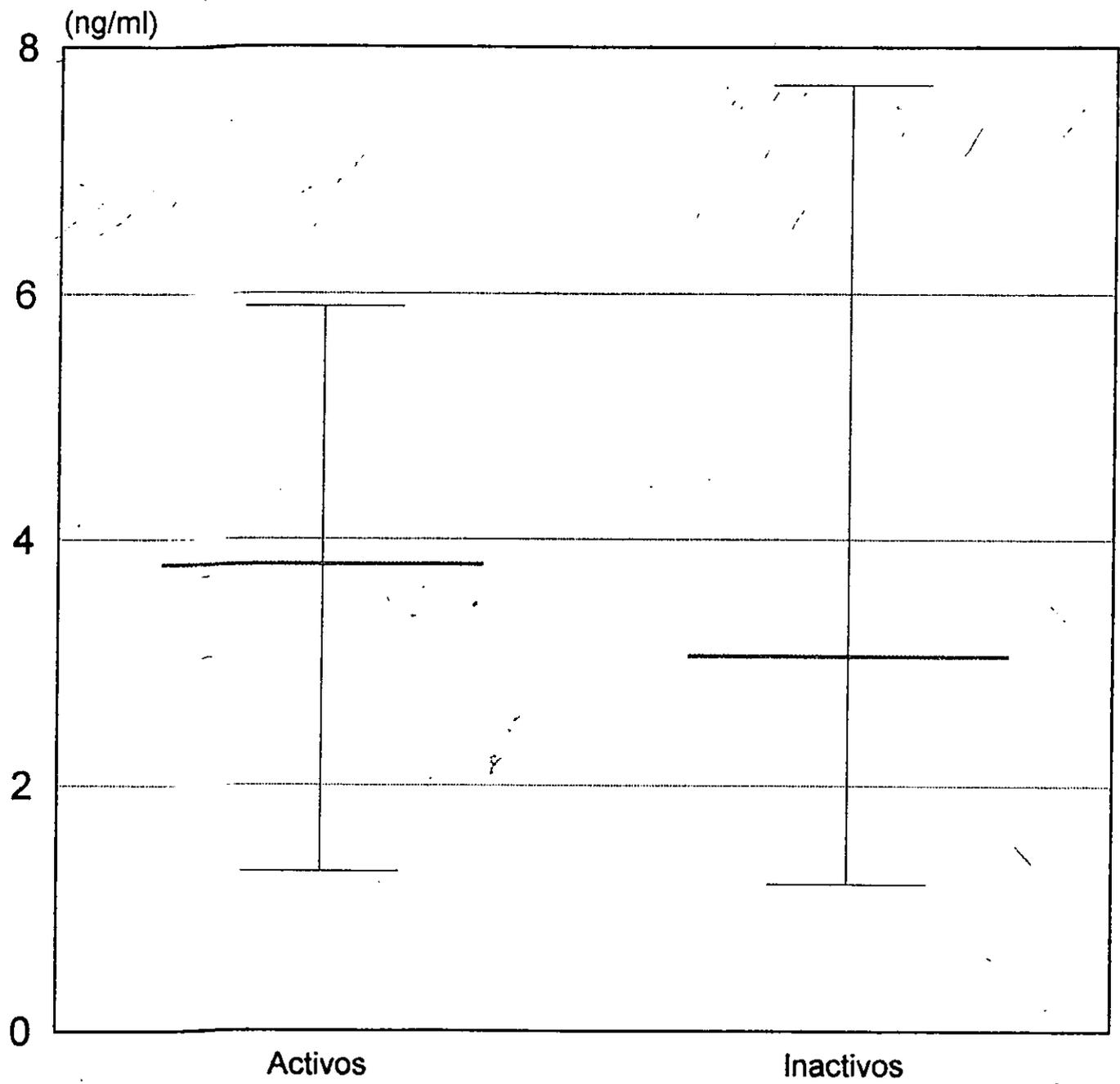
La molécula de Fas soluble también está surgiendo como un interesante candidato para explicar la mayor incidencia del LES y probablemente de los fenómenos autoinmunes patogénicos en general en las mujeres jóvenes. Poulton y cols. encontraron que hay una mayor transcripción del RNAm de Fas soluble que es dependiente del sexo y de la edad<sup>43</sup>. Las mujeres sanas menores de 30 años tienen una tasa mayor de lectura del RNAm de Fas soluble que las mujeres sanas de más de 40 años. La tasa de lectura de los hombres persiste invariable, independientemente de la edad. Asimismo, Mountz y cols. reportaron que una proporción mayor de pacientes con LES con menos de un mes de evolución clínica de la enfermedad tienen niveles mayores de Fas soluble que el grupo correspondiente al total de pacientes con LES, independientemente del tiempo de evolución clínica (50 vs 25%).

Esto abre una serie de posibilidades interesantes: la presencia de Fas soluble en grandes cantidades permitiría la persistencia de linfocitos autorreactivos en la periferia durante un tiempo prolongado, convirtiéndose así en un fenómeno permisivo para el posterior desarrollo de una respuesta autoinmune. Si estos linfocitos se activaran durante el tiempo en que persisten viables gracias al bloqueo del ligando de Fas en su superficie por la molécula de Fas soluble, ya sea por encontrarse con el autoantígeno directo capaz de estimularlos, o por un fenómeno de reactividad cruzada con antígenos virales o bacterianos, tendríamos al madurarse y afinarse la respuesta un fenómeno autoinmune similar al que se induce en modelos animales, con la posterior diseminación de epítopes restringida a familias de proteínas<sup>44</sup>, tal y como ocurre en el LES humano. Para poder descartar esta posibilidad, sería necesario un seguimiento prospectivo de familiares directos de pacientes con la enfermedad, cuando menos durante los años en que la incidencia de la enfermedad es mayor, y vigilar cuidadosamente la aparición y el comportamiento posterior de cualquier fenómeno autoinmune. Este es el siguiente paso para definir de manera más precisa el papel real de la molécula de Fas soluble en el LES.

TABLA 1.-Características generales.

	<b>Activos</b>	<b>Inactivos</b>	<b>p</b>
<b>Edad (años)</b>	28-49	22-54	n.s.
<b>SLEDAI</b>	0-2	3-10	-
<b>Anticuerpos antinucleares (diluciones)</b>	neg-1 :320	neg-1 :320	-
<b>Anticuerpos anti-DNA dc (U/ml)</b>	45->100	0-8	-
<b>FasS (ng/ml)</b>	1-310-5.909	1.241-7.798	n.s.

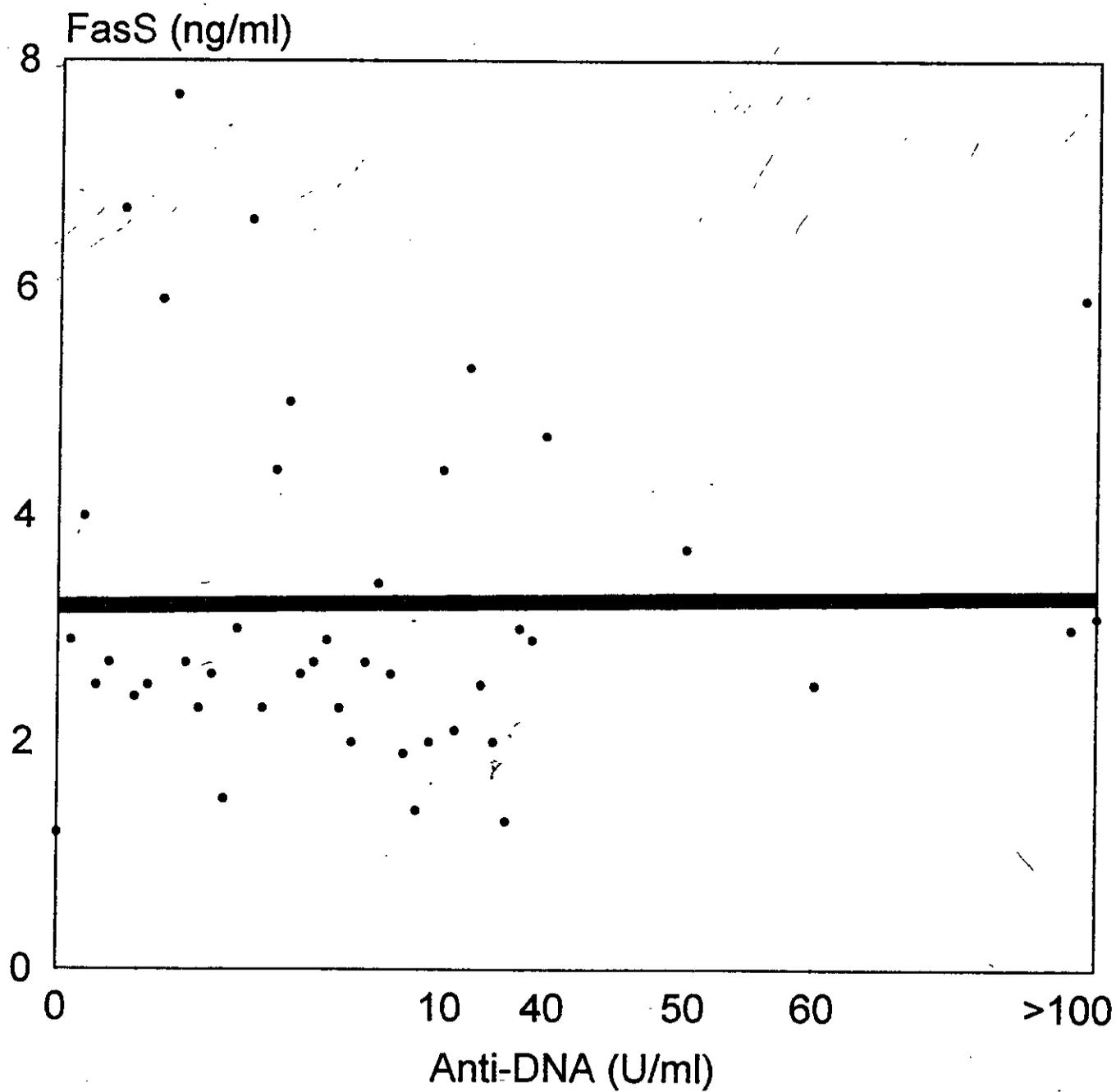
Figura 1.-Valores de Fas S en pacientes con L.E.S



Activos: 9 Inactivos: 40

Figura 2.-Anti-DNA y Fas S.

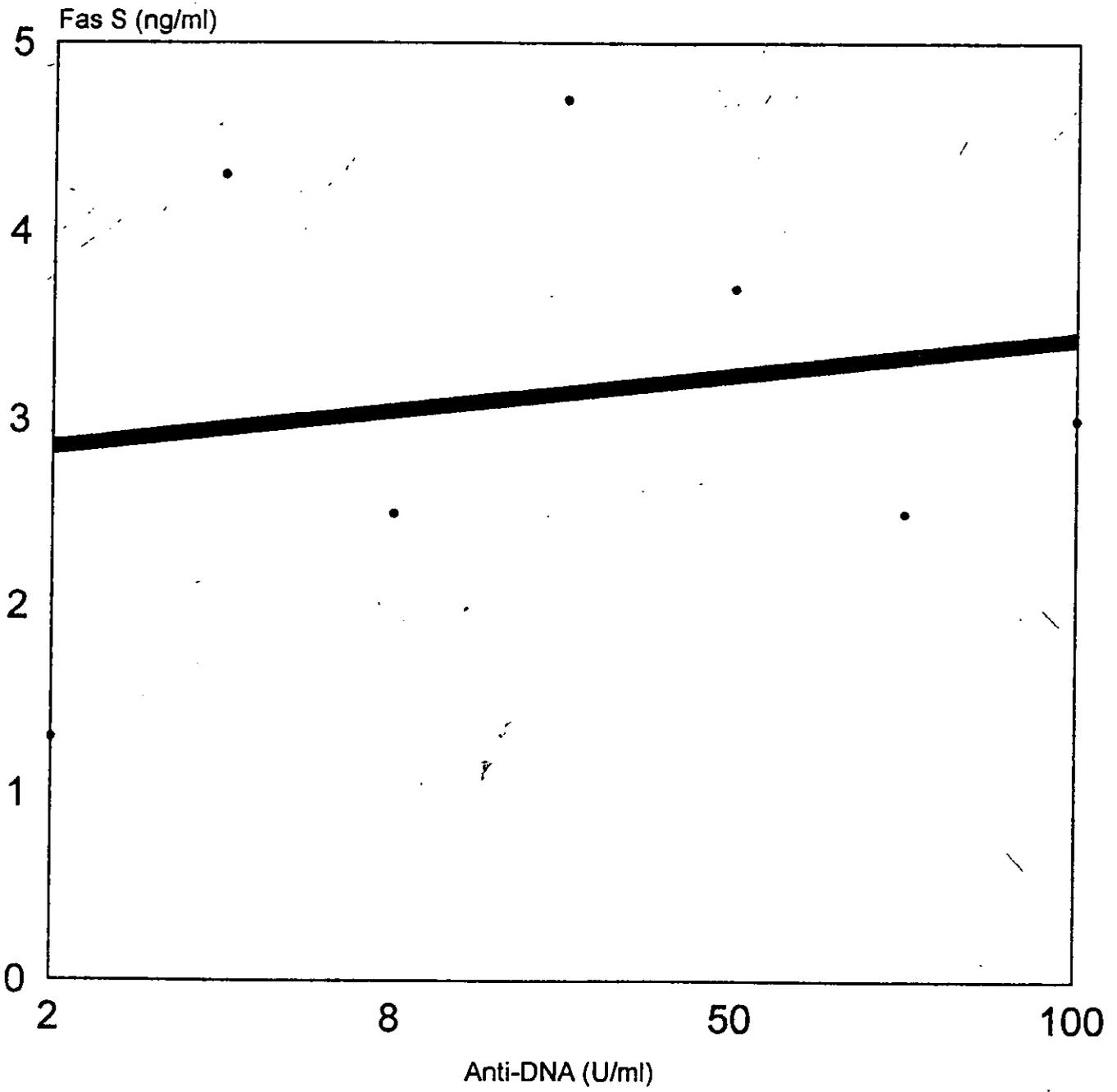
Todos los pacientes



$r = -0.014$   $p < 0.05$

Figura 3.-Anti-DNA y Fas S.

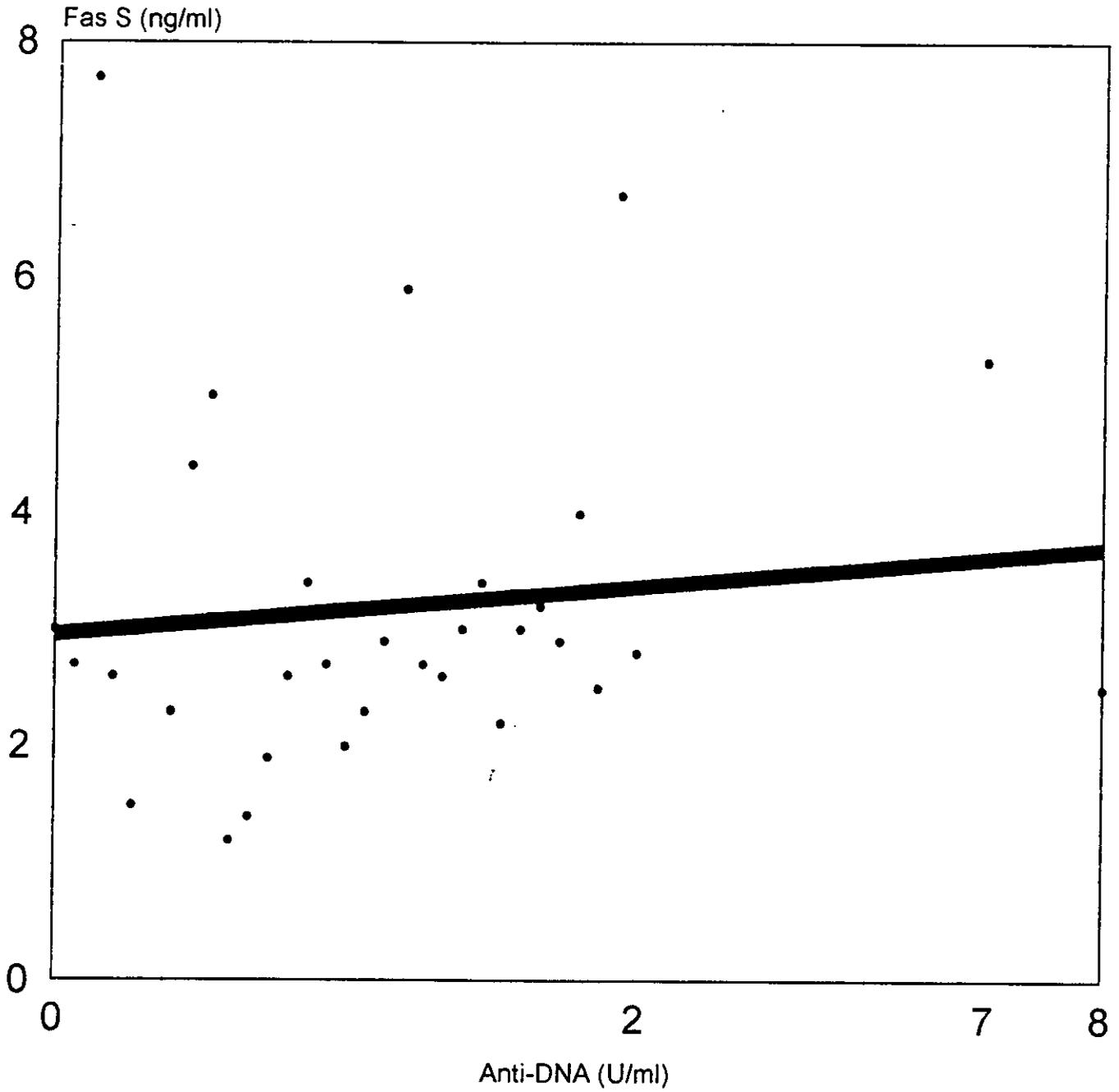
Pacientes activos



$r=0.17$   $p<0.05$

Figura 4.-Anti-DNA y Fas S.

Pacientes inactivos



$r=0.11$   $p<0.05$

## REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> Majno G, Joris I.-Apoptosis, Oncosis and Necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995 146:3-15
- <sup>2</sup> Steller H.-Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995 267:1445-1449
- <sup>3</sup> Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS.-Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992 10:267-293
- <sup>4</sup> Cotter TG.-Programmed to die. Cell death in the immune system. *Immunologist* 1993 1:181-184
- <sup>5</sup> Crispe IN.-Fatal interactions: Fas-induced apoptosis of mature T cells. *Immunity* 1994 1:347-349
- <sup>6</sup> Moreno J.-Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. 1a. edición. Noriega editores S.A. de C.V. México, 1996.
- <sup>7</sup> Singer GG, Abbas AK.-The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994 1:365-371
- <sup>8</sup> Tsubata T, Wu J, Honjo T.-B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 1993 364:645-648
- <sup>9</sup> Vignaux F, Golstein P.-Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngenic activated lymphocytes: a regulatory pathway? *Eur J Immunol* 1994 24:923-927
- <sup>10</sup> Crispe IN.-Fatal interactions: Fas-induced apoptosis of mature T cells. *Immunity* 1994 1:347-349
- <sup>11</sup> Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Debatin KM, Krammer PH.-Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995 373:438-441
- <sup>12</sup> Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, Green DR.-Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-

---

ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995 373:441-444

<sup>13</sup> Ju S, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, El-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A.-Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995 373:444-448

<sup>14</sup> Veis DJ, Sentman CL, Bach EA, Korsmeyer SJ.-Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 1993 151:2546-2554

<sup>15</sup> Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S.-Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* 1993 151:621-627

<sup>16</sup> Smith CA, Farrah T, Goodwin RG.-The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 1994 76:959-962

<sup>17</sup> Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N.-Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992 149:3753-3758

<sup>18</sup> Nagata S.-Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv Immunol* 1994 57:129-144

<sup>19</sup> Elkon KB.-Autoantibodies in SLE. In: Klippel JH, Dieppe PA (editors): *Rheumatology*. Mosby Year Book Europe Limited. Hong Kong, 1994.

<sup>20</sup> Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T.-Autoimmune diseases. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994 37:1415-1420

<sup>21</sup> Watanabe-Fukunaga R, Brannan CF, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S.-Lymphoproliferation disorders in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992 356:314-317

<sup>22</sup> Rathmell JC, Goodnow CC.-Effects of the *lpr* mutation on elimination and inactivation of self-reactive B cells.

<sup>23</sup> Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, Harris AW.-Enforced BCL2 expression in B-Lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 88:8661-8665

---

- 
- <sup>24</sup> Ohsako S, Hara M, Harigai M, Fukasawa C, Kashiwasaki S.-Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1994 73:109-114
- <sup>25</sup> Mysler E, Bini P, Drappa J, Ramos P, Friedman SM, Krammer PH, Elkon KB.-The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994 93:1029-1034
- <sup>26</sup> Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD.-Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994 263:1759-1762
- <sup>27</sup> Pisetsky DS.-Anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin NA* 1992 18:437-454
- <sup>28</sup> TerBorg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CGM.-Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1990 33:634-643
- <sup>29</sup> Isenberg DA, Ehrenstein MR, Longhurst C, Kalsi JK.-The origin, sequence, structure, and consequences of developing anti-DNA antibodies. *Arthritis Rheum* 1994 37:169-180
- <sup>30</sup> Rathnell JC, Goodnow CC.-Effects of the *lpr* mutation on elimination and inactivation of self-reactive B cells. *J Immunol* 1994 153:2831-2842
- <sup>31</sup> Kinjman DM, Eisenberg RA, Steinberg AD.-Development of the autoimmune B cell repertoire in MRL *lpr/lpr* mice. *J Immunol* 1990 144:506-511
- <sup>32</sup> Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chand CH et al.-Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992 35:630-640
- <sup>33</sup> Mountz JD, Pierson MC, Zhou T, Cheng J, Elkon KB, Hasunuma T, Nishioka K, Okumura K, Lin A, Song GG, Dale JK, Gorley M, Straus SE.-sFas expression in patients with autoimmune disease. (Abstract). *Arthritis Rheum* 1995 etc.etc.
- <sup>34</sup> Siegel S.-Estadística no paramétrica. Editorial Trillas. 3a. edición. México, 1994. Pg.238-242

- 
- <sup>35</sup> Clark EA, Ledbetter JA.-How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994 367:425-428
- <sup>36</sup> Gmeling-Meyling F, Dawisha S, Steinberg AD.-Assesment of in vivo frequency of mutated T cells in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Exp Med* 1992 175:297-300
- <sup>37</sup> Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJA, Mysler E, Elkon KB.-Levels of soluble Fas/APO1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995 38:1735-1737
- <sup>38</sup> Goel N, Ulrich DT, St.Clair W, Fleming JA, Lynch DH, Seldin MF.-Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1995 38:1738-1743
- <sup>39</sup> Mountz JD, Pierson MC, Zhou T, Cheng J, Elkon KB, Hasunuma T, Nishioka K, Okumura K, Lin A, Song GG, Dale JK, Gorley M, Straus SE.-sFas expression in patients with autoimmune disease. (Abstract). *Arthritis Rheum* 1995 38 (suppl):S174
- <sup>40</sup> Le Deist F, Emile JF, Rieux-Laucat F, Benkerrou M, Roberts I, Brousse N, Fischer A.-Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* 1996 348:719-723
- <sup>41</sup> Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB.-Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Eng J Med* 1996 335:1643-1649
- <sup>42</sup> Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD.-Fas ligand mutation in a patient with Systemic Lupus Erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996 98:1107-1113
- <sup>43</sup> Poulton KV, Hajeer A, Hillarby MC, Ollier WER.-Alternatively spliced Fas mRNA in SLE. (Abstract). *Arthritis Rheum* 1995 38 (suppl):S266
- <sup>44</sup> Elson CJ, Barker RN, Thompson SJ, Williams NA.-Immunologically ignorant autoreactive T cells, epitope spreading and repertoire limitation. *Immunol Today* 1995 16:71-75