

1 03081

2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**“ESTUDIO DE ALGUNOS GENES REGULADORES DE APOPTOSIS  
EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO  
Y EN RATONES CON ENFERMEDAD AUTOINMUNE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
(INMUNOLOGIA)

PRESENTA

CLAUDIA ALVARADO DE LA BARRERA

MEXICO, 1998.

266723

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán bajo la asesoría del Dr. Jorge Alcocer Varela y la co-asesoría del Dr. Luis Llorente Peters.

JURADO:

Presidente: Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Secretario: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

Primer vocal: Dr. Jorge Alcocer Varela

Segundo vocal: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Tercer vocal: Dr. Luis Covarrubias Robles

Suplente: Dr. Guillermo Alfaro Martínez

Suplente: Dr. Ricardo Rosales Ledezma

Agradecimientos:

Al Dr. Luis Llorente, Dr. Jorge Alcocer Varela, Dr. Donato Alarcón Segovia, Dra. Carmen Fernández y QC.

Yvonne Richaud por su valioso apoyo y aporte de conocimientos.

A mis padres, Elia y Ernesto

A Silvia, Héctor y Ernesto

	Página
<b>Indice</b>	I
<b>Resumen</b>	3
<b>Introducción</b>	4
I. Patogenia de las enfermedades autoinmunes	4
II. Lupus eritematoso generalizado (LEG)	8
Criterios para la clasificación de LEG	9
Criterios de actividad del LEG	9
III. Determinantes genéticos en LEG	11
IV. Alteraciones en el sistema inmune en el LEG	13
V. Red de citocinas en LEG	15
Interleucina (IL) -2	16
IL-1	17
IL-4	18
IL-6	19
Factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa	19
IL-10	20
Interferón (IFN)-gamma	23
VI. Lupus Eritematoso generalizado y muerte celular programada	24
VII. Genes reguladores de apoptosis	27
Bcl-2	28
Bax	29

	Página
c-Myc	29
p53	31
Fas y Gld	31
c-Fos y c-Jun	33
VIII. Modelos animales de enfermedad autoinmune órgano inespecífica	34
NZB	34
(NZB x NZW) F1	35
MRL	35
Síndrome de linfadenopatía generalizada	35
BXSB	36
Modelos transgénicos de enfermedad autoinmune	36
<b>Objetivos</b>	37
<b>Hipotesis</b>	38
<b>Parte I. Participación de Fas y Bcl-2 en la apoptosis de linfocitos B.</b>	
<b>Parte II. Anormalidades en la expresión genética de TNF-alfa y genes reguladores de proliferación y muerte celular programada en médula ósea de pacientes con lupus eritematoso generalizado.</b>	
<b>Conclusiones Parte I</b>	39
<b>Conclusiones Parte II</b>	42
<b>Perspectivas terapéuticas</b>	48
<b>Bibliografía</b>	52



## RESUMEN

El Lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune órgano inespecífica que se caracteriza por la producción de múltiples autoanticuerpos dirigidos contra moléculas ubicuas celulares (nucleares, citoplásmicas y de membrana). En el LEG se observan también diversos trastornos de la inmunorregulación, mismos que generan anomalías en la inmunidad celular y humoral. La identificación de los procesos mediante los cuales se lleva a cabo el rompimiento de la tolerancia a lo propio, permitirá entender la patogenia de este padecimiento.

El sistema inmune emplea diversos mecanismos para preservar la homeostasis, uno de ellos es la apoptosis. La regulación anormal de estos eventos parece tener consecuencias patogénicas en ciertas enfermedades autoinmunes.

En la primera parte de esta tesis se estudió la participación de Fas y Bcl-2 en la regulación de la muerte celular de linfocitos B. Se emplearon dos cepas de ratones caracterizadas por tener mecanismos deficientes de apoptosis: 1) ratones transgénicos C57BL/6-E  $\mu$ -*bcl-2*-22 que expresan el proto-oncogen *bcl-2* en las células B; 2) mutantes C57BL/6-*lpr/lpr* que son incapaces de expresar una molécula Fas funcional. Ambas cepas desarrollan una enfermedad similar al LEG. Como control normal se emplearon ratones de la cepa C57BL/6. Se indujo la apoptosis mediante diferentes tratamientos y posteriormente se cuantificó el número de células en apoptosis. Los resultados muestran que la mutación *lpr* y la sobre-expresión del proto-oncogen *bcl-2* confieren resistencia a la apoptosis inducida por los tratamientos estudiados.

En la segunda parte de esta tesis se estudió la expresión de algunos genes reguladores de crecimiento y muerte celular programada en médula ósea de pacientes con LEG. Se analizó la expresión espontánea de *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *p53*, Fas y factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa en células de médula ósea de 8 pacientes con LEG y 8 individuos normales. Se encontró un incremento en la expresión de TNF-alfa y *bcl-2* en células de médula ósea provenientes de pacientes con LEG. Estas células expresaron *bax*, *c-myc*, *c-fos* y *p53* en cantidades significativamente menores que las células provenientes de sujetos sanos. Los resultados sugieren que la expresión anormal de genes reguladores del crecimiento y muerte celular programada en médula ósea de pacientes con LEG, podría explicar la presencia de las células autorreactivas que se han encontrado en centros linfoides secundarios y sangre periférica de estos pacientes.

En conjunto, los resultados sugieren que la regulación anormal de los procesos involucrados en la muerte celular programada parecen tener consecuencias patogénicas en ciertas enfermedades autoinmunes.

## INTRODUCCION

### I. Patogenia de las enfermedades autoinmunes

El sistema inmune está capacitado para reconocer epítopes inmunogénicos de cualquier proteína, diversos carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos del organismo, dado que son moléculas con dominios potencialmente antigénicos. Por tanto, la autoinmunidad es la respuesta contra lo propio. Esta respuesta puede o no tener efectos adversos para el organismo, en caso de tenerlos, las condiciones que genera se denominan "enfermedad autoinmune". Este término implica condiciones patológicas, en tanto que la autoinmunidad puede encontrarse en el contexto de las interacciones celulares fisiológicas del reconocimiento a lo propio.

Durante el reconocimiento a lo propio, las moléculas del Sistema Principal de Histocompatibilidad (SPH) tienen gran relevancia. Debido a su alto grado de polimorfismo, estas glucoproteínas presentes en la superficie celular, permiten que los linfocitos T reconozcan antígenos asociados exclusivamente a moléculas autólogas del SPH.

Se han postulado diversos mecanismos para explicar la tolerancia a lo propio. La primera hipótesis postula que clonas autorreactivas de linfocitos deben ser eliminadas o inactivadas funcionalmente al encontrarse con antígenos propios durante la ontogenia. La segunda hipótesis implica la presencia de linfocitos T supresores. Dado que la existencia de estas células no ha sido comprobada, esta noción ha perdido credibilidad. La tercera hipótesis de la tolerancia propone que la homeostasis del sistema inmune se basa en el fino equilibrio de una gran red de especificidades idiotipo/anti-idiotipo de los linfocitos T y B. Como se explicará más adelante, esta tesis está orientada hacia el estudio de la primera hipótesis.

Las enfermedades difusas del tejido conjuntivo, también llamadas de la colágena, son enfermedades generalizadas, de base autoinmune, que comparten entre sí diferentes manifestaciones clínicas y serológicas. La etiología de estas enfermedades se desconoce, pero los mecanismos que dan lugar a la inflamación y daño de las articulaciones y de otros tejidos, parecen tener un origen multifactorial (1). Este incluye a los agentes iniciales (infecciosos, químicos o biológicos) que alteran la homeostasis inmunológica de un individuo genéticamente susceptible a desarrollar una enfermedad reumática. Estamos expuestos a la acción de un número importante de sustancias extrañas, sin embargo, nuestro sistema inmune tiene éxito en su enfrentamiento la gran mayoría de las veces, y solo en algunos casos la inflamación y la respuesta inmune exagerada o en contra de nuestros propios tejidos, se perpetúan y llevan a destrucción de los tejidos involucrados. Si bien sus manifestaciones clínicas pueden ser parecidas y los mecanismos patogénicos en cierta forma sobreponerse, los órganos blanco de la alteración inflamatoria mediada por mecanismos inmunes suele ser diferente en cada una de estas enfermedades. Las enfermedades del tejido conjuntivo se caracterizan por una alteración numérica y funcional de las células T inmunorreguladoras y por la activación policlonal de las células B, con la resultante producción de autoanticuerpos. Al conocerse la dicotomía funcional existente entre células de ayuda TH1 y TH2 en el humano, cuyas diferencias se manifiestan en el patrón de producción de citocinas, se ha hecho evidente la importante participación de estos mediadores en la patogenia de los padecimientos autoinmunes.

Existen varias hipótesis que consideran a los factores ambientales como los principales agentes causales en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Una de ellas es la hipótesis del mimetismo molecular, según la cual, ciertos péptidos provenientes de agentes infecciosos tienen un alto grado de homología con proteínas del huésped, incluso con epítopes que forman parte del SPH. El reconocimiento de estas

estructuras por el sistema inmune genera una respuesta contra péptidos propios (2). Las moléculas provenientes de agentes infecciosos que han recibido mayor atención en este sentido son las proteínas de choque térmico. Debido a su expresión ubicua y a su alto grado de semejanza entre diferentes especies (e.g. células de mamíferos y bacterias), es posible que generen respuestas autoinmunes adversas (3). Además del mimetismo molecular, los agentes infecciosos podrían promover las enfermedades autoinmunes mediante diversos mecanismos, tales como: daño tisular, liberación de antígenos secuestrados, exposición de antígenos crípticos mediante la inducción de moléculas del SPH, inducción de la expresión ectópica de otras moléculas, alteración del perfil de citocinas, activación inespecífica de linfocitos T y actividad exhaustiva de las células del sistema inmune.

A pesar de que se han asociado ciertos agentes infecciosos con determinadas enfermedades autoinmunes (e.g. enfermedad de Chagas con *Trypanozoma cruzi*, artritis con micobacterias), en la mayoría de los casos no ha sido posible aislar al agente infeccioso del tejido lesionado. Podría especularse que esto se debe a la capacidad del patógeno para inducir inflamación en tejidos con los que comparte epítopes antigénicos, a pesar de no haber tenido contacto con ellos (4).

Diversas enfermedades se han asociado con alelos del SPH, sobre todo aquellas en las que se piensa que los trastornos inmunológicos son de primera importancia en su fisiopatogenia. Las enfermedades autoinmunes presentan alteraciones multigénicas, pero la asociación más clara con estos padecimientos se ha establecido con los genes del SPH. La explicación más simple de este hecho radica en que las enfermedades autoinmunes dependen de la respuesta de linfocitos T, y las respuestas de estas células están restringidas por las moléculas del SPH (5).

Las enfermedades autoinmunes son numerosas. Cuando se limitan a ciertos tejidos se denominan órgano específicas y cuando trascienden barreras estromales, se les define como órgano inespecíficas o generalizadas. La lista que a continuación se muestra, incluye sólo algunas de las enfermedades autoinmunes descritas, pues pretende mostrar que los tejidos involucrados son diversos (6):

<b>Enfermedad</b>	<b>Tejido afectado</b>	<b>Haplotipo asociado</b>
Lupus eritematoso generalizado	conectivo y vascular	DR3
Artritis reumatoide	conectivo y vascular	DR4
Sjögren	glándulas salivales y lacrimales	DR3
Tiroiditis autoinmune	tiroides	DR5
Enfermedad de Graves	tiroides	DR3
Enfermedad de Addison	corteza suprarrenal	DR3
Anemia perniciosa	células parietales del estómago	DR5
Hepatitis crónica activa	hígado	B8?
Uveítis anterior aguda	uvea	B27
Esclerosis múltiple	sistema nervioso central	DR2
Anemia hemolítica autoinmune	eritrocitos	?
Pénfigo vulgaris	dermis	DR4
Miastenia gravis	placa neuromuscular	DR3
Diabetes mellitus autoinmune	células beta del páncreas	DR3,DR4

## II. Lupus eritematoso generalizado

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune órgano inespecífica, cuyas manifestaciones clínicas son extremadamente diversas y variables. Algunos pacientes manifiestan afección cutánea y dolor articular con períodos espontáneos de remisión. Estos pacientes requieren dosis bajas de medicamentos tales como aspirina, anti-inflamatorios no esteroideos, hidroxicloroquina, etc. Estos medicamentos atenúan los síntomas de la inflamación debido a que previenen la generación de prostaglandinas proinflamatorias y metabolitos derivados de la lipoxigenasa a partir del ácido araquidónico. Los agentes anti-inflamatorios también modulan la respuesta inmune mediante la inhibición de la función de los leucocitos polimorfonucleares. El otro extremo del espectro incluye pacientes que presentan daño renal grave y progresivo (glomerulonefritis), afección del sistema nervioso central y citopenias. Tales pacientes suelen recibir glucocorticoides en dosis altas y fármacos citotóxicos como la ciclofosfamida (7). Cabe mencionar que los glucocorticoides ejercen su efecto mediante diferentes mecanismos, que incluyen tanto la regulación de la transcripción genética, como la regulación postranscripcional de ciertas proteínas. En este caso, afectan tanto la estabilidad del RNAm, como la traducción y secreción de proteínas. Los glucocorticoides inhiben la síntesis de algunas citocinas y sus receptores (e.g. factor de necrosis tumoral-alfa, interleucina-2 e interleucina-6), prolactina, sintetasa de monóxido de nitrógeno, ciclooxigenasa 2, endotelina 1 y fosfolipasa A<sub>2</sub>. Así pues, también mediante la interferencia en la cascada del ácido araquidónico, la síntesis de mediadores de la inflamación es inhibida por los glucocorticoides.

Con el fin de facilitar el diagnóstico y estudio de los pacientes con LEG, se ha procurado unificar los criterios de clasificación de este padecimiento.

***Criterios de clasificación del LEG (8):***

- 1) Eritema malar
- 2) Eritema discoide
- 3) Fotosensibilidad
- 4) Ulceras orales
- 5) Artritis
- 6) Serositis: pleuritis y/o pericarditis
- 7) Alteración renal: proteinuria y/o cilindros celulares
- 8) Alteración neurológica: convulsiones y/o psicosis en ausencia de medicamentos ofensivos o alteraciones metabólicas conocidas (e.g. uremia, cetoacidosis, desequilibrio electrolítico).
- 9) Alteración hematológica: anemia hemolítica con reticulocitosis y/o leucopenia, linfopenia, trombocitopenia en ausencia de medicamentos ofensivos.
- 10) Preparación de célula LE positiva y/o anticuerpos anti-DNA nativo a títulos anormales.
- 11) Anticuerpos antinucleares a títulos elevados en ausencia de medicamentos asociados con el "síndrome de lupus inducido por medicamentos".

Esta clasificación se basa en 11 criterios. Se dirá que una persona tiene LEG si manifiesta 4 ó más de los 11 criterios, en forma seriada o simultáneamente.

***Criterios de actividad de LEG:*** El término "actividad de la enfermedad" evalúa la gravedad de las manifestaciones clínicas en los pacientes con LEG en un momento determinado. No existe un consenso universal de este concepto, así como tampoco hay un índice único para su validación. La actividad de la enfermedad no describe el pronóstico del paciente.

El índice MEX-SLEDAI (9) correlaciona la actividad de la enfermedad con el valor total de los siguientes criterios:

Daño neurológico 8

Afección renal 6

Vasculitis 4

Hemólisis y trombocitopenia 3

miositis 3

artritis 2

afección mucocutánea 2

serositis 2

fiebre 1

fatiga 1

leucopenia y linfopenia 1

Diversos estudios indican que se requiere de la contribución de factores ambientales, genéticos y hormonales para la manifestación de la enfermedad. Se ha mostrado que fármacos tales como la hidralazina y procainamida, entre otros, pueden inducir un síndrome similar al LEG (10).

La incidencia del LEG en mujeres es aproximadamente nueve veces mayor que en hombres, lo cual sugiere que el balance entre hormonas feminizantes y masculinizantes tiene un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Los estrógenos tienden a acelerar las manifestaciones del LEG, en tanto que los andrógenos suelen tener un papel protector (11). Los estrógenos parecen promover la



autoinmunidad en parte mediante el incremento en la producción de prolactina, que induce la actividad del sistema inmune (12). La hiperprolactinemia es frecuente en pacientes con LEG (13). Además la enfermedad suele activarse durante el embarazo (14), cuando los niveles de estrógenos y prolactina se incrementan (15).

### **III. Determinantes Genéticos en lupus eritematoso generalizado**

La alta prevalencia de LEG en gemelos monocigotos ha mantenido el interés en el estudio de los factores genéticos, que por un lado predisponen a autoinmunidad y por otro influyen sobre la magnitud y especificidad de la respuesta inmune, una vez que las condiciones de autoinmunidad se han establecido (16). Alrededor del 10% de los familiares de pacientes con LEG llegan a presentar la enfermedad y el 30% desarrollan alguna alteración inmunológica como anticuerpos antinucleares positivos, o bien la producción aumentada de IL-10 (17).

Varios marcadores genéticos se encuentran alterados en los pacientes con lupus, como es la frecuencia aumentada de ciertos fenotipos Gm. Los determinantes antigénicos Gm son la consecuencia de polimorfismos localizados en el fragmento Fc de las cadenas pesadas de las IgG. Los anticuerpos anti-Gm se localizan usualmente en la fracción IgM, aunque pueden encontrarse también en las fracciones IgG e IgA. Otro marcador genético que suele encontrarse alterado en pacientes con LEG es el receptor de complemento tipo 1 (CR1) presente en eritrocitos. La deficiente expresión de esta molécula puede alterar la eficiencia en los procesos de fagocitosis y depuración de complejos inmunes. Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, se ha estudiado el papel de los genes polimórficos codificados por el SPH en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Se han encontrado frecuencias elevadas de HLA B8, DR2,

DR3 y C4 homocigoto, así como deficiencias en C4A y/o C4B. En los pacientes de origen caucásico, el haplotipo extendido más común, siguiendo su orden en el cromosoma es: HLA-A\*1,HLA-B\*8,BF\*S,C2\*C,C4A\*0,C4B\*1,HLA-DR\*3,HLA-DQ\*2. Este haplotipo se asocia en caucásicos con la mayoría de las enfermedades autoinmunes incluyendo el LEG y el síndrome de Sjögren primario. Otros grupos étnicos tienen sus propios haplotipos extendidos. En México, existen dos haplotipos extendidos: HLA-A2, B35, DR4, BF\*S, C2\*C, C4A\*3, C4B\*1 y HLA-A9, B39, DR4, BF\*S, C2\*C, C4A\*3, C4B\*1. En la población mexicana los genes más relevantes en la susceptibilidad al LEG son el DR3 y los alelos nulos de C4 (C4A\*Q0). Se desconoce si el LEG se asocia a un solo alelo del SPH (i.e. C4AQ0 contra DR3) o si la asociación es con un haplotipo extendido ( i.e. [ HLA-B8; SC01;DR3]). Sin duda, la asociación genética más fuerte parece ser con los alelos nulos de C4, asociación encontrada en varios grupos étnicos. La deficiencia de C4 se atribuye a deleciones de genes, aunque otros mecanismos genéticos pueden prevenir su expresión. Las asociaciones DR3 y B8, de hecho, se han atribuido a la presencia de genes nulos de C4A, una deleción genética peculiar a este haplotipo al menos en individuos caucásicos. En parte, el interés del papel de C4B se deriva de la observación de que en pacientes con deficiencias homocigóticas de complemento, particularmente de los componentes tempranos, poseen un riesgo mayor de padecer LEG. Esta asociación genética, puede no reflejar un papel directo de las moléculas de clase II en la patogénesis de la enfermedad, pero sí un papel de los productos de otros genes que existen en desequilibrio de unión como parte de alotipos HLA más extendidos. Las asociaciones de alelos nulos parecen ser el único factor hereditario que relaciona fronteras raciales y étnicas en negros americanos, mexicanos y orientales (18).

#### IV. Alteraciones del sistema inmune en el lupus eritematoso generalizado

El evento inmunológico fundamental de los pacientes con LEG es la activación policlonal de linfocitos B y la producción de autoanticuerpos, en particular en contra de moléculas intracelulares. La activación policlonal de los linfocitos B podría ser espontánea o dirigida por el antígeno y/o los linfocitos T. Numerosos trabajos apoyan en forma indirecta la participación del antígeno y de los linfocitos T en la hiperactividad de los linfocitos B en el LEG. Esta podría deberse a una falla en la inducción de tolerancia inmunológica en los linfocitos T, que tiene como resultado una interacción T-B antígeno específica, o inespecífica mediada por otras moléculas accesorias que participan en la activación T-dependiente de los linfocitos B. La interacción con linfocitos T CD4<sup>+</sup> resultaría en la activación de los linfocitos B autorreactivos con el consiguiente "cambio" de isotipo de IgM a IgG. Además, el antígeno seleccionaría las clonas de mayor afinidad, como consecuencia de la mutación somática característica de la respuesta secundaria. Existen cuando menos tres posibles explicaciones para el amplio espectro de alteraciones observadas en las células T de pacientes con LEG: 1) La existencia de señales inhibitoras provenientes de células supresoras. 2) Una alteración en la regulación que llevan a cabo las citocinas, particularmente aquellas relacionadas con eventos tempranos de los mecanismos de activación celular. 3) La permanente activación de células T, que desencadena un estado "exánime" o de cansancio celular. La presencia de linfocitos T activados *in vivo*, es demostrada por la expresión de marcadores de activación como lo son CD25 (cadena alfa del receptor para IL-2), CD71, moléculas clase II y VLA-1 (19).

Una alternativa al reconocimiento específico por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de péptidos asociados a las moléculas clase II de los linfocitos B podría ser dada por las interacciones inespecíficas entre moléculas accesorias durante el contacto físico entre linfocitos T y B. Una de ellas es la molécula coestimuladora CD28, que se

ha encontrado sobreexpresada en linfocitos T de pacientes con LEG, que llevaría a una disminución de la inducción de tolerancia periférica. Otra interacción de interés es la molécula accesoria CD40, expresada por linfocitos B, con su ligando, expresado predominantemente por linfocitos T activados. En el hipotético caso de una interacción aumentada entre estas moléculas, el resultado sería una hiperactivación de los linfocitos B, sin necesidad de que los linfocitos T tuvieran que reconocer antígenos específicos en la superficie de aquellos.

La activación policlonal de linfocitos B se refleja cualitativa y cuantitativamente en el perfil de autoanticuerpos característico de pacientes con LEG (20). Se han descrito anticuerpos contra diversos componentes celulares, de los cuales algunos son: antígenos nucleares, antígenos citoplasmáticos, factores de la coagulación, antígenos presentes en eritrocitos, antígenos linfocitarios, plaquetarios, antígenos órgano específicos (tiroideos, hepáticos, musculares, adrenales), etc. Probablemente los autoanticuerpos participan en la patogenia del LEG como constituyentes de complejos inmunes acoplados con su antígeno correspondiente. Se depositan en articulaciones, vasos pequeños o glomérulos, en donde pueden causar apoptosis o, con la participación del complemento, inflamación y necrosis. Además, pueden interactuar directamente con el antígeno en sitios específicos de los órganos o las células. Esta reacción puede ocurrir con elementos celulares para los que hay autoanticuerpos, tales como los antígenos específicos de las paredes de eritrocitos o las plaquetas, causando anemia hemolítica o trombocitopenia, respectivamente. La reacción puede ocurrir también con un antígeno que se encuentre depositado en las membranas basales, como se ha postulado para el DNA en la piel y los glomérulos. Finalmente, los autoanticuerpos pueden contribuir a las alteraciones en la regulación inmunológica mediante su interacción con linfocitos para producir linfopenia.

## V. Red de citocinas en lupus eritematoso generalizado

Las citocinas abarcan un amplio espectro de reguladores de proteínas celulares y han sido clasificadas en familias, como interleucinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), hemopoyetinas y quimiocinas. Esta clasificación, es hasta cierto punto, artificial ya que algunas citocinas clasificadas como IL son hemopoyetinas, e.g. la IL-3, quimiocinas, e.g. IL-8., mientras que el IFN-gamma y el TNF-alfa son verdaderas IL con múltiples efectos funcionales sobre otras células del sistema inmune, de otros sistemas, y en el proceso inflamatorio. Todas ellas son de bajo peso molecular (menos de 80 kD) y suelen estar glicosiladas. Primeramente interactúan con receptores de alta afinidad localizados en la superficie de las células y, posteriormente, regulan la transcripción de varios genes celulares mediante segundas señales, aún no bien definidas, que conducen a cambios en el comportamiento celular. La secreción de citocinas es el resultado de la activación (específica o no) de los linfocitos T. Una vez secretadas, las citocinas no tienen especificidad inmunológica ya que actúan sobre cualquier célula con receptores para ellas, independientemente del estímulo inicial. Algunas citocinas tienen gran sobreposición funcional entre ellas.

Después del contacto inicial con el antígeno, los linfocitos T CD4+ secretan predominantemente IL-2 y se consideran indiferenciados (CD4+ tipo 0, TH0). Con el tiempo, los linfocitos TH0 se diferencian en dos subpoblaciones que se distinguen por las citocinas que producen. Los linfocitos T CD4+ tipo 1 (TH1) secretan predominantemente IFN-gamma, IL-2 y TNF-beta y proliferan en respuesta a la IL-2. Los linfocitos T CD4+ tipo 2 (TH2) secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y proliferan en respuesta a IL-2 ó IL-4. Ambas poblaciones secretan IL-2, IL-3 y factor estimulador de colonias granulocítico-monocítico (GM-CSF).

La IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-14 favorecen la inmunidad humoral, mientras que la IL-2, IL-12, IL-5, TNF-alfa, el GM-CSF y el IFN-gamma favorecen la inmunidad celular. Sin embargo, durante la respuesta inmune se activan ambas ramas. Así, la IL-2 y el IFN-gamma también participan en la inmunidad humoral, mientras que la IL-4 y la IL-6 lo hacen en la inmunidad celular (19).

Aunque no es fácil identificar las subpoblaciones de linfocitos T inductores *in vivo*, los patrones de citocinas secretadas por esplenocitos CD8 de ratones inmunizados sugieren una distribución similar. La diferenciación a TH1 ó TH2 depende de factores como la naturaleza del antígeno y la presencia de ciertas citocinas. Durante el reconocimiento antigénico por los linfocitos T, la presencia de IL-4 induce diferenciación a TH2, mientras que la IL-12 a TH1. Otro aspecto relevante en la generación de TH1 ó TH2, son las células presentadoras de antígeno. Se ha sugerido que *in vitro* los linfocitos B inducen preferentemente células TH2, mientras que los macrófagos favorecen la activación de linfocitos TH1.

**IL-2:** La expresión de citocinas ha sido el objetivo de numerosos estudios desde 1982, en que varios grupos informaron que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LEG eran deficientes en la producción de, y en la respuesta a, IL-2 (21). Actualmente se desconoce el mecanismo molecular responsable de esta deficiencia. Se ha propuesto que podría ser el resultado de la expresión elevada de algún factor supresor, que como se explicará más adelante, podría ser la IL-10 (22).

La primera citocina caracterizada fue la IL-2, secretada por los linfocitos T. Se une a receptores de alta afinidad en linfocitos T y B activados, y de afinidad intermedia en células NK. La IL-2 induce proliferación y diferenciación de dichas células. La expresión del gen de IL-2 requiere el estímulo antigénico y señales

coestimuladoras (23). Aunque inicialmente se pensó que la IL-2 sería indispensable para el desarrollo del sistema inmune normal, en estudios en humanos y modelos animales *in vivo* se encontró que la ausencia congénita de IL-2, no afecta el desarrollo del sistema inmune ni su funcionamiento ulterior. No obstante, los defectos en algunas cadenas de su receptor (con excepción de la cadena alfa), resultan en inmunodeficiencia profunda. La IL-2 estimula la proliferación de los linfocitos T y los tímocitos, coestimula la proliferación y diferenciación de las células B, aumenta la producción de citocinas por las células T y aumenta la función citotóxica de los linfocitos T y de las células asesinas naturales. La IL-2 es producida tanto por las células CD4+ como por las CD8+, pero solo después de su activación y no en reposo. Para la producción de IL-2 se requiere el reconocimiento por parte del receptor de la célula T del antígeno presentado por una molécula del SPH y la fijación de CD28 en la célula T por CD80 en la célula presentadora del antígeno. El interferón-gamma y la vasopresina pueden estimular la producción de IL-2, mientras que los glucocorticoides, la ciclosporina-A y la prostaglandina E<sub>2</sub> inhiben su producción (19).

**IL-1:** Esta citocina es esencial para la producción *in vitro* de IgG por células mononucleares de pacientes con LEG. Se han encontrado niveles elevados de IL-1 y de células que expresan su receptor en cultivos de corta duración de células mononucleares no estimuladas de pacientes con LEG. Asimismo, existe una expresión constitutiva aberrante de RNAm para IL-1 en células mononucleares recién obtenidas de pacientes con LEG con actividad de la enfermedad y hay presencia de esta citocina a nivel renal. Sin embargo, *in vitro*, los monocitos de pacientes con LEG son pobres productores de IL-1 (24).

La IL-1 alfa y beta son secretadas por una gran variedad de células, predominantemente macrófagos y queratinocitos, tienen múltiples efectos en la respuesta inflamatoria, inducen secreción de TNF-alfa e IL-6

que son pirógenos endógenos y proinflamatorias. La IL-1 es producida principalmente por monocitos y macrófagos, y en pequeñas cantidades por linfocitos B, linfocitos T, células asesinas naturales, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos. Hay dos formas de IL-1, la IL-1-alfa y la IL-1-beta, codificadas por dos genes distintos, con una homología de tan solo 20% entre sí pero interactúan con los mismos receptores y son funcionalmente indistinguibles. La IL-1 tiene múltiples acciones en la respuesta inmunológica e inflamatoria. Promueve la actividad citotóxica de los linfocitos T y de las células asesinas naturales, aumenta la producción de reactantes de fase aguda, aumenta el crecimiento de los fibroblastos, aumenta la resorción ósea, induce fiebre y puede inducir la expresión de la IL-2 y de receptores de ésta en los linfocitos T. La IL-1 puede desencadenar la expresión de colagenasas, fosfolípidos y ciclooxigenasa en células aisladas de cartílago y hueso (19).

*IL-4:* Se ha reportado que en los sobrenadantes de células mononucleares de pacientes con LEG existen niveles elevados de IL-4 y, al adicionar IL-4 recombinante a cultivos de células B de lupus, se aumenta la producción de IgG, aunque no se ve afectada la proliferación de estas células (25).

La IL-4 es producida por células T CD4+ del tipo TH2. Coestimula la proliferación de células B, aumenta la proliferación de las células T, induce aumento de la expresión de las moléculas clase II del SPH en las células B y aumenta la expresión del receptor Fc de baja afinidad para la IgE (CD23) en células B y monocitos. En humanos, la IL-4 y la IL-13 inducen cambio de isotipo a IgE e IgG4. La IL-4 inhibe la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> y la generación de superóxido por los monocitos. Sin duda su papel más importante es en la respuesta IgE hacia parásitos y alérgenos. El receptor de la IL-4 es una molécula de cadena sencilla de 130 kD que está presente en las células B, las células T, las células cebadas y los



monocitos. La IL-4 tiene diversos efectos sobre los linfocitos B, como aumento en su viabilidad, y en la expresión de moléculas clase II y algunas otras moléculas accesorias que participan en su activación. Otras células capaces de secretar IL-4 son las células cebadas, los macrófagos y los linfocitos B (19).

**IL-6:** Esta es quizá la más pleiotrópica de las citocinas, también se ha encontrado elevada en el LEG. Se ha demostrado su presencia en suero y en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes, particularmente en aquellos con enfermedad activa. También se ha encontrado presente en biopsias de riñones afectados. Los factores que conducen a la expresión constitutiva de IL-6 en pacientes con LEG no se conocen en la actualidad, pero pueden incluir a otras citocinas reguladoras (26).

La IL-6 es producida principalmente por monocitos y macrófagos, aunque también es producida por los linfocitos T del tipo TH2, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales y células neuronales. Induce el crecimiento de plasmacitomas, la activación de las células T y la producción de reactantes de fase aguda por los hepatocitos. La IL-6 es un mediador inmunológico e inflamatorio fundamental, que comparte muchos de sus efectos celulares con los de la IL-1 y el TNF-alfa, a pesar de que cada una de estas citocinas posee receptores independientes. El receptor de la IL-6 consta de dos cadenas, una alfa de 80 kD que fija a la IL-6 y una glicoproteína de 130 kD que transduce la señal a la célula (19).

**TNF-alfa:** El papel del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa (ahora denominado linfotoxina-alfa) en LEG no es claro, su producción se encuentra disminuída en las células de pacientes con haplotipo DR2/DQw1, pero se encuentra elevada en pacientes de haplotipo DR3 y DR4. La producción disminuída de TNF-alfa se ha asociado con daño renal en pacientes con LEG, lo cual sugiere que el TNF-alfa tiene un efecto

protector contra la nefritis lúpica (27). Dada la bien documentada asociación del LEG con el SPH y al hecho de que el TNF-alfa se codifica en el brazo corto del cromosoma 6, estos hallazgos podrían ser de particular relevancia en la etiología del LEG (28).

El TNF-alfa y el TNF-beta son citocinas muy relacionadas entre sí, son codificadas dentro de los genes del SPH. Se producen principalmente por monocitos y macrófagos, aunque también pueden ser producidas por linfocitos T y células NK. Ambas citocinas promueven la citólisis de células tumorales, inducen la expresión de la integrina Mac-1 y tienen efecto sinérgico con el IFN-gamma para la inducción de moléculas clase II del SPH. *In vivo*, el TNF al igual que la IL-1 y la IL-6, puede causar fiebre, choque, caquexia, respuesta de fase aguda y activación del catabolismo protéico. Se considera que el TNF es el mediador principal del choque en la bacteremia por gram-negativos y del síndrome de choque tóxico. En varias estirpes celulares se han descrito por lo menos tres receptores diferentes para TNF, de 55kD a 80kD. De los TNF, el más abundante es el TNF-alfa, inicialmente sintetizado como proteína de membrana que es liberada mediante hidrólisis de su porción extracelular por proteasas. Esta citocina además activa osteoclastos, e induce apoptosis en algunas células (19).

**IL-10:** Recientemente se reportó la expresión constitutiva del gen de IL-10 y de la producción de ésta citocina en pacientes con LEG (29), artritis reumatoide (AR) y síndrome de Sjögren (30), independientemente de la actividad de las enfermedades o del tratamiento. En estos tres padecimientos, la producción de esta citocina es por parte de los monocitos y linfocitos B (al menos en sangre periférica). A diferencia de los efectos benéficos de la IL-10 en las lesiones articulares de la AR, en el LEG predomina el efecto estimulador de la producción de autoanticuerpos, que juegan un papel clave en su patogenia. La

importante participación de la IL-10 sobre la producción de autoanticuerpos ha sido comprobada al transferir células de pacientes con LEG a ratones inmunosuprimidos SCID. Este trabajo demostró además, que la producción de anticuerpos anti-DNA de doble cadena es mucho más sensible a la IL-10 que a la producción de inmunoglobulinas totales. Se han reportado resultados similares en AR en donde al parecer, la producción endógena de IL-10 es la responsable de la presencia de anticuerpos con actividad de factor reumatoide y no tiene actividad sobre la producción del resto de las inmunoglobulinas (31).

Se ha demostrado que la IL-10 protege a los linfocitos B de la muerte en centros germinales de órganos linfoides, fenómeno que se encuentra relacionado con un aumento en la expresión de Bcl-2. La eliminación de linfocitos B por apoptosis a nivel de centros germinales es determinante en la constitución de un repertorio normal de linfocitos B libre de células autorreactivas. Es posible que al modificar la expresión de Bcl-2 y, por tanto el proceso de selección negativa, la IL-10 en el LEG, actúe de manera directa sobre la conformación del repertorio de células B, favoreciendo a aquéllas con propiedades autorreactivas (32).

Cabe mencionar que, fuera del sistema inmune, la placenta y los queratinocitos radiados con luz ultravioleta son importantes productores de IL-10, lo que podría explicar la exacerbación del LEG por exposición al sol y durante el embarazo. La producción excesiva de IL-10 en el LEG también puede explicar la disminución de la inmunidad mediada por células y particularmente, la deficiente producción y respuesta a la IL-2 como se mencionó anteriormente. Asimismo, la IL-10 podría amplificar la inmunosupresión iatrogénica causada por los esteroides y contribuir, de esta forma, a la susceptibilidad a

infecciones que se manifiesta en los pacientes con LEG. Así, la IL-10 ocupa un papel central en la fisiopatogenia del LEG y, principalmente, en la formación de autoanticuerpos, que es el resultado de su acción autócrina por los linfocitos B y parácrina por los macrófagos.

La IL-10 es producida principalmente por linfocitos T CD4+ del tipo TH2 y en menor grado por monocitos, linfocitos B y queratinocitos. Inhibe la producción de la IL-1, la IL-6 y el TNF por macrófagos activados. La IL-10 inhibe también la capacidad de los macrófagos para estimular a las células T del tipo TH1 para producir IFN-gamma y aumenta la proliferación de los linfocitos T CD8+ en respuesta a la IL-2. La IL-10 inhibe la mayoría de las funciones de los macrófagos y la de los linfocitos T, aunque en menor grado, y promueve la diferenciación de los linfocitos B. Por otra parte, favorece una respuesta de tipo humoral sobre una respuesta celular durante las reacciones inmunológicas inducidas por antígeno. La inhibición de las funciones de los macrófagos es ejercida a múltiples niveles. La IL-10 inhibe la producción y transcripción de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos, específicamente IL-1, IL-6, IL-8 y TNF-alfa. Este efecto se encuentra restringido a las células de esta estirpe, ya que la producción de dichas citocinas por células endoteliales prácticamente no se altera por la IL-10. Por otra parte, la IL-10 inhibe a nivel de membrana la expresión de otras proteínas (B7, ICAM, moléculas clase II) que participan de manera importante en el procesamiento y presentación antigénica a linfocitos T de ayuda. Al actuar sobre linfocitos T, la IL-10 impide la proliferación, y la inhibición de la producción de IFN-gamma. En contraste con las propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras sobre la respuesta inmune mediada por células, la IL-10 ejerce un efecto estimulador sobre los linfocitos B. De hecho, la IL-10 es el principal promotor de la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas (19).

**Interferón (IFN)-gamma:** Esta citocina aumenta la producción de IgG de células mononucleares de pacientes con LEG. Más aún, se han encontrado anticuerpos anti-IFN gamma en el suero de pacientes con LEG así como en sus riñones afectados, lo que sugiere que existe una continua producción de IFN-gamma *in vivo* en LEG y que, acaso, esta citocina podría contribuir al daño renal. Al igual que con la IL-2, los niveles de RNAm para IFN-gamma en células mononucleares estimuladas *in vitro* de pacientes con LEG son muy bajos (33).

El IFN-gamma es producido por las células T CD4+ del tipo TH1, linfocitos CD8+ y células asesinas naturales. Es un mediador importante de la inflamación e induce o aumenta la expresión de moléculas clase II del SPH en células mononucleares y muchas otras estirpes celulares. Estimula la actividad tumoricida y microbicida, aumenta la expresión del receptor Fc en macrófagos, aumenta la producción de TNF y disminuye la producción de IgG1 e IgE. El IFN-gamma tiene actividad antiproliferativa y antiviral para muchos tipos de células. Aumenta la biosíntesis de muchas proteínas del complemento, incluyendo C3 y C4 y al factor B. También parece aumentar las respuestas de hipersensibilidad retardada, mientras que influye de manera negativa a la inmunidad humoral. El receptor para esta molécula es un trímero compuesto de una glicoproteína de 90kD (con un núcleo proteico de 65kD y un oligosacárido de 25kD), una subunidad de 200kD y una subunidad de 38kD. Con excepción de los eritrocitos, prácticamente la mayoría de las células expresan receptores para el IFN-gamma. Este puede inducir la expresión de moléculas clase II del SPH en células que normalmente no las expresan. Debido a que las moléculas clase II participan importantemente en la presentación antigénica, se ha hipotetizado que esta expresión aberrante de moléculas clase II inducida por el IFN-gamma podría conducir a una respuesta autoinmune contra autoantígenos (19).

Es claro que las citocinas participan en la fisiopatogenia del LEG, bien sea de manera directa o por vía de su complicada red de interacciones. Mientras mejor se definan los efectos específicos de éstas moléculas en el LEG, más posibilidades habrá de vislumbrar nuevos abordajes terapéuticos basados en drogas inductoras de su producción, incluso a las mismas citocinas o de antagonistas específicos de ellas, que puedan llegar a completar o a reemplazar el arsenal terapéutico que, hasta la fecha, es insuficiente.

#### **VI. Lupus eritematoso generalizado y muerte celular programada**

La muerte celular programada es una forma fisiológica de muerte, en la que las células participan de manera activa en su propia destrucción. Tiene un papel importante en el desarrollo, crecimiento y recambio tisular. A pesar de que la maquinaria de muerte es intrínseca a la célula, está sujeta a estímulos externos. La muerte celular programada se lleva a cabo tanto en nemátodos como en mamíferos, incluyendo las especies comprendidas entre los extremos de este espectro evolutivo.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada. Algunos de los criterios que la distinguen de la necrosis son: 1) La reducción en el volumen celular, acompañada del incremento en la densidad celular, compactación de los organelos y dilatación del retículo endoplásmico. 2) La condensación de la cromatina, que aparece como una banda discontinua de zonas granulares. Este cambio morfológico se asocia con la activación de una endonucleasa nuclear que fragmenta la cromatina. 3) El cambio en la superficie celular, que permite el reconocimiento de las células apoptósicas por los macrófagos. En ciertos casos se requiere de la síntesis activa de proteínas, probablemente las que constituyen el programa de muerte celular (34).

Los rearrreglos genéticos producidos en el receptor de las células T y B son parte de la estrategia empleada por el sistema inmune para generar repertorios amplios y versátiles de linfocitos. De manera inevitable, estos eventos simultáneamente producen linfocitos potencialmente autoreactivos. Para eliminar a estas células, el organismo emplea diversos mecanismos que le permiten establecer la tolerancia a lo propio. Uno de ellos es la apoptosis, por tanto, las deficiencias en el proceso de apoptosis afectan a la tolerancia (35).

En el sistema inmune la apoptosis se lleva a cabo en órganos linfoides primarios tales como la médula ósea, hígado y timo. En el timo, las células T que se unen a péptidos propios con extrema avidéz, y por tanto son autorreactivas, son eliminadas. Las células que no reconocen péptidos propios en el contexto de moléculas del SPH, son ignoradas y tampoco sobreviven. Los timocitos que reconocen péptidos propios en el contexto de moléculas del SPH con avidéz intermedia, son seleccionadas. Solamente los timocitos que sobreviven a los procesos de selección pueden diferenciarse en linfocitos T maduros para así migrar a centros inmunes periféricos (36). En órganos linfoides secundarios tales como ganglios linfáticos y bazo, opera un mecanismo selectivo similar sobre células T y B. En la periferia, es necesario controlar la activación linfocitaria, para prevenir así la acumulación de niveles altos de citocinas. Así pues, la eliminación de linfocitos T y B activados mediante apoptosis es necesaria para contener la respuesta inmune y evitar que ésta se perpetúe.

Cada día es más aceptada la idea de que en los pacientes y en ciertos modelos animales de LEG (*lpr* y *gld*), el proceso de apoptosis es aberrante. Los cultivos *in vitro* muestran que el índice de apoptosis en linfocitos provenientes de pacientes con LEG es considerablemente mayor que en linfocitos provenientes

de sujetos sanos. En cambio, la situación *in vivo* es distinta pues se ha reportado que la apoptosis en los pacientes con LEG y en los ratones *lpr* está disminuída (37). La aparente discrepancia entre la disminución de apoptosis *in vivo*, y el incremento de ésta *in vitro*, puede explicarse al considerar que los linfocitos provenientes de pacientes con LEG y de ratones *lpr* suelen estar activados *in vivo*. Una vez que estos linfocitos se encuentran en cultivos *in vitro*, mueren por apoptosis inducida por la privación súbita de factores de crecimiento y por la perturbación del balance inmunológico en el que se encontraban *in vivo*. En este caso, como en muchos otros, es importante tener cuidado al extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* a la situación *in vivo*.

Las alteraciones en ciertos mecanismos de apoptosis en linfocitos de pacientes con LEG han sido descritas por diversos grupos, pero recientemente se han encontrado también deficiencias en la depuración de complejos inmunes y en la fagocitosis de cuerpos apoptósicos en los macrófagos de estos pacientes (38). Normalmente las células que mueren por apoptosis son fagocitadas rápidamente, pero de no ocurrir así, sus nucleosomas son liberados. En los pacientes con LEG, la prevalencia de anticuerpos anti-nucleosoma es del 88%. Además, se ha encontrado correlación entre los títulos de estos anticuerpos y la actividad de la enfermedad. Un mecanismo mediante el cual los nucleosomas podrían contribuir al daño renal en el LEG, es mediante el depósito de complejos inmunes en riñón y la subsecuente activación de complemento (39).

En resumen, las anormalidades en la apoptosis podrían contribuir a la patogénesis del LEG de dos formas: 1) Dado que la apoptosis contribuye al establecimiento de la tolerancia, las fallas en este proceso podrían ocasionar la sobrevivencia de células autorreactivas. Estas, a su vez, podrían amplificar la respuesta



inmune contra antígenos propios (e.g. nucleosomas). Los autoantígenos podrían también inducir la activación policlonal de linfocitos B. 2) Los linfocitos autorreactivos que han escapado a la apoptosis inducida por autoantígenos, podrían proliferar y después ser estimulados a entrar en el proceso de apoptosis (inducida por activación) y contribuir así al incremento de nucleosomas.

## VII. Genes reguladores de apoptosis

La predisposición genética a la autoinmunidad se ha asociado frecuentemente con genes que regulan directamente la respuesta inmune, tales como los del SPH. Debido a que en ciertas enfermedades autoinmunes no ha sido posible encontrar un sesgo importante en el uso de alelos del SPH, se ha sospechado de la participación de otros genes en la predisposición a la autoinmunidad. Recientemente se han descrito varios genes que al regular el ciclo celular, crecimiento y muerte de las células del sistema inmune, probablemente confieran susceptibilidad a la manifestación de enfermedades autoinmunes. Un grupo de genes que ha recibido especial atención en este sentido son los proto-oncogenes, que codifican proteínas implicadas en señales de transducción. Estas proteínas interfieren con la transmisión de señales reguladoras de la replicación, que van de la membrana celular hasta el núcleo (40).

***Bcl-2***: Existe una gran controversia sobre la existencia de anomalías en la expresión de Bcl-2 en linfocitos de individuos con LEG. Algunos grupos han encontrado que su expresión es normal en células mononucleares de estos pacientes (41). Otros grupos en cambio, han detectado niveles elevados de esta proteína en linfocitos T (42), concretamente en la subpoblación de fenotipo CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>. Aparentemente estos linfocitos T pueden cooperar con los linfocitos B en la producción espontánea de anticuerpos anti-DNA de isotipo IgG (43).

Bcl-2 se describió originalmente como una proteína oncogénica que retrasa la apoptosis. Su expresión en adultos está restringida a células longevas como las neuronas, linfocitos T y B maduros, progenitores hematopoyéticos, tejido regulado hormonalmente, células progenitoras del intestino y la epidermis (44).

Diversos grupos han reportado que la expresión elevada de Bcl-2 interfiere con la apoptosis inducida por glucocorticoides, daño al DNA y agentes oxidantes (45). La capacidad de Bcl-2 para inhibir la apoptosis ha sido relacionada con su localización (en la parte externa de la membrana mitocondrial, en la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico). El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) resulta de la distribución asimétrica de iones, lo cual genera un gradiente eléctrico. El componente de  $\Delta pH$  de este  $\Delta\psi_m$  es esencial para el funcionamiento de la fosforilación oxidativa. Durante el proceso de apoptosis, se generan canales en la membrana celular y mitocondrial, que disipan el potencial de protones, por lo que abaten la fosforilación oxidativa e inducen una disminución en el  $\Delta\psi_m$ . Bcl-2 inhibe la apoptosis en parte mediante la interferencia en la formación de poros en la membrana, lo cual obstaculiza la disminución en el  $\Delta\psi_m$  (46).

Bcl-2 también interfiere con el proceso de apoptosis mediante la regulación de la distribución intracelular del citocromo c. El citocromo c se codifica por un gene nuclear, posteriormente es traducido por ribosomas del citosol a apocitocromo c. Este último se transloca a la mitocondria, donde un grupo hemo se le une covalentemente, para dar lugar al holocitocromo c. El incremento en el holocitocromo c en el citosol durante la apoptosis implica que la mitocondria participa en este proceso mediante la liberación de citocromo c. La consecuencia directa de la liberación del citocromo c al citosol es la activación de una serie de proteasas denominadas caspasas, mismas que activan el programa de muerte celular. El

incremento en la expresión de Bcl-2, inhibe la liberación de citocromo c y con ello la consecuente activación de las caspasas y la apoptosis (47).

Dado que Bcl-2 puede inhibir la apoptosis en órganos linfáticos secundarios, se ha postulado que podría interferir en los procesos de selección negativa de linfocitos autoreactivos (48). Bcl-2 tiene también la capacidad de inhibir la muerte celular programada de timocitos inducida por depleción de IL-7, pero no inhibe la apoptosis de éstas células en ratones *rag-1<sup>-/-</sup>*. Lo anterior implica que Bcl-2 inhibe la apoptosis inducida por carencia de factores de crecimiento, pero no interviene en el proceso de selección negativa de los linfocitos T incapaces de rearreglar los genes del receptor (49).

**Bax:** El papel de Bax en la regulación de la muerte celular de células de pacientes con LEG apenas empieza a explorarse. Esta proteína promueve la muerte celular. Bax puede formar complejos homodímeros, o debido a su alto grado de homología con Bcl-2, puede asociarse con ésta formando complejos heterodiméricos. En este fino sistema de regulación entre Bax y Bcl-2, es la proporción entre ambas la que determinará si una célula que recibe señales de muerte va a aceptarlas o a ignorarlas. La estructura de Bax se ha conservado entre las especies pues hay un 96% de homología entre la proteína humana y la de ratón. Al parecer, la síntesis de Bax no es una respuesta de novo ocasionada por estímulos de muerte, pues se encontró la expresión de este gen en tejidos normales y en varias líneas celulares antes de que las células recibieran la señal de muerte (50).

**c-Myc:** La expresión de c-Myc depende de estímulos mitogénicos y se requiere para prevenir la diferenciación e inducir la proliferación. c-Myc normalmente funciona como regulador positivo de la

transcripción, pues al formar heterodímeros con Max, el complejo formado reconoce una secuencia específica en el DNA, el hexanucleótido CACGTG (51).

La expresión continua de c-Myc ha sido detectada en la progresión de un gran número de neoplasias. Su potencial oncogénico se ha demostrado con animales transgénicos, en los cuales requiere por lo general de la cooperación de otros oncogenes tales como Bcl-2 o Ras (52). c-Myc es un componente nuclear esencial de las vías que transmiten señales de transducción. En células normales, la expresión de c-Myc ocurre sólo en la fase G1 del ciclo celular, pues su expresión se induce rápidamente durante el inicio de la replicación y disminuye cuando las células están en reposo. La inhibición en la expresión de esta proteína previene la proliferación e induce la diferenciación celular (53).

Recientemente se han descrito otras funciones de c-Myc, como es su capacidad de inducir apoptosis. La muerte celular programada inducida por c-Myc en ciertos casos puede ser inhibida por Bcl-2 (54). La función de c-Myc durante los eventos de muerte celular programada no es clara. En los linfocitos B inmaduros la estimulación del receptor los conduce a la apoptosis y se acompaña de la disminución en la expresión de c-Myc. En cambio, el mismo estímulo en linfocitos B maduros, induce proliferación y el aumento en la expresión de c-Myc. Al parecer, los diferentes efectos de la regulación transcripcional de c-Myc dependen en parte del estado de diferenciación en que se encuentran las células (55). El incremento en la expresión de c-Myc durante los eventos de apoptosis se ha asociado también con su poder de interferencia en el ciclo celular. En condiciones normales las células expresan c-Myc y proliferan en respuesta a la adición de factores de crecimiento. En cambio, la expresión inducida de esta proteína en células en reposo desprovistas de factores de crecimiento, las conduce a la apoptosis (56). De lo anterior

se puede especular que la expresión errática de c-Myc es la que se asocia con su papel de promotor de muerte celular.

**p53:** Hasta el momento, la mayoría de los estudios se han enfocado hacia el papel antitumoral de p53, pues éste es el gen que con más frecuencia se encuentra mutado en cáncer (57). Actualmente se cuenta con poca información sobre la posible participación de p53 en los eventos de selección del repertorio de linfocitos, y por tanto en la generación de enfermedades autoinmunes.

La proteína p53 tiene un importante papel en el desarrollo de tumores, pues las mutaciones en el gen que la codifica tienen consecuencias oncogénicas. La principal función de p53 es detener la replicación del DNA en caso de que éste haya sufrido una mutación. Si p53 detecta alteraciones en el DNA, tiene la capacidad de mantener a las células en la fase G1. De este modo, si la célula puede reparar la mutación, podrá replicar su DNA. En caso de que la mutación sea irreparable, p53 inducirá apoptosis (58). Las células carentes de p53 son resistentes a la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos y radiación. No todas las vías de apoptosis dependen de p53, puesto que las células carentes de p53 pueden morir mediante apoptosis inducida con glucocorticoides (59).

**Fas y Gld:** El sistema Fas-Gld funciona eficientemente en la citotoxicidad mediada por células y en el control de la respuesta inmune. Ambas moléculas se expresan en órganos linfáticos secundarios, donde promueven la eliminación de células activadas para limitar así la respuesta inmune (60).

El papel de Fas y su ligando no es claro en la patogenia del LEG. Se han detectado niveles relativamente elevados de Fas soluble en el 10-50% de los pacientes con LEG. Se ha postulado que la molécula soluble podría estar inhibiendo la apoptosis mediada por Fas en linfocitos activados. De esta manera podría explicarse la elevada proporción de linfocitos activados en sangre periférica de pacientes con LEG (61). Asimismo, la expresión de Fas de membrana y soluble es elevada en pacientes con distintas enfermedades reumáticas (polimiositis/dermatomiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo y síndrome de Sjögren) (62).

Existen evidencias de anomalías genotípicas y fenotípicas de Fas en individuos con padecimientos autoinmunes. Se han descrito casos de pacientes que presentan la mutación *lpr* y desarrollan un síndrome linfoproliferativo. Este padecimiento tiene un gran parecido con las alteraciones inmunológicas observadas en pacientes con LEG (63, 64). En pacientes con LEG, las mutaciones en Fas se manifiestan en la disminución de la apoptosis inducida por activación y el incremento en la proliferación inducida por activación (65).

En el proceso de muerte celular mediada por Fas, el correcto funcionamiento de Fas es tan importante como el de su ligando, la proteína Gld. Las mutaciones en Gld causan un síndrome linfoproliferativo similar al ocasionado por la mutación *lpr* en ratones (66). La proteína Gld al igual que Fas, también se expresa principalmente en células activadas durante la respuesta inmune. Gld tiene gran semejanza estructural con Fas y los demás miembros de la familia del TNF-alfa codificados por el cromosoma 6, pero a diferencia de éstos, se codifica en el cromosoma 1 en humanos (67).

Existe controversia sobre el papel del sistema Fas-Gld en la eliminación de células hematopoyéticas. Por una parte se ha propuesto que la muerte celular de células pre-B, pro-B y linfocitos B en médula ósea no está mediada por Fas, es decir que esta proteína está involucrada en la eliminación de linfocitos B activados en centros germinales más no en médula ósea (68). Por otra parte, se ha encontrado que la supresión de la hematopoyesis está mediada en gran parte por Fas (69).

**c-Fos y c-Jun:** Ambas proteínas son componentes del factor de transcripción AP1. c-Jun forma homodímeros para ser funcional, en tanto que Fos puede formar heterodímeros con c-Jun o con miembros de su familia. Los complejos así formados, se unen a la secuencia de reconocimiento TGACTCA de AP1, y así regulan la expresión de ciertos genes. AP1 es el factor que regula la transcripción promovida por ésteres de forbol y diversos factores de crecimiento. c-Fos se localiza en el núcleo, su expresión se asocia con eventos de proliferación y diferenciación, pues su inducción por mitógenos y factores de crecimiento es necesaria para la entrada al ciclo celular. Cabe mencionar que en estos casos, la expresión de c-Fos es transitoria.

Al igual que a c-Fos, a c-Jun se le asocia con proliferación, pues pertenece a una familia de reguladores de la transcripción y está considerado como parte del grupo de genes de respuesta temprana. Al estimular las células con agentes mitogénicos o factores de crecimiento, estos genes presentan una respuesta inmediata pero transitoria (70).

La expresión continua de estas moléculas se ha asociado con la muerte celular programada (71). Un ejemplo de ello es el de la apoptosis inducida por hipoxia e isquemia en neuronas (72). En otro sistema

también se encontró un incremento en la expresión de c-Fos y c-Jun al privar de factores de crecimiento a células linfoides dependientes de IL-2 e IL-6. Lo anterior sugiere, que en ciertos casos, la expresión de estos oncogenes podría representar un evento temprano en la activación del programa de muerte celular (73). Otra evidencia del incremento en la expresión de c-Fos y c-Jun en procesos de muerte celular programada, se describió en el tejido mamario durante la ablactación. Se ha comprobado que durante este período, la regresión de este tejido se efectúa por apoptosis (74).

#### **VII. Modelos animales de enfermedad autoinmune órgano inespecífica**

Los ratones que desarrollan enfermedad autoinmune de manera espontánea debido a alteraciones genéticas, se han estudiado desde hace más de 30 años. Sin excepción, la enfermedad autoinmune en estos animales progresa con la edad. La inducción de padecimientos autoinmunes en ratones normales es otra área de investigación. Durante la última década se han generado modelos de ratones transgénicos diseñados con la intención de estudiar la autorreactividad experimental. En estos casos, se han introducido transgenes que codifican para inmunoglobulinas, para el receptor de células T (TCR), para antígenos propios o para antígenos exógenos que de esta forma, se transforman en antígenos propios (75). A continuación se mencionarán las cepas más frecuentemente utilizadas como modelos de enfermedad autoinmune órgano inespecífica.

**a)NZB:** Los ratones de esta cepa desarrollan enfermedad autoinmune generalizada. Presentan títulos elevados de anticuerpos anti-eritrocitos, anti-timocitos y anti-ssDNA, entre otros. Las células afectadas en principio son las de médula ósea. La hiperactividad de los linfocitos B es evidente desde que nacen, además frecuentemente desarrollan trastornos relacionados con estas células (76).



**b) (NZB x NZW)<sub>F1</sub>.** Esta cepa fue generada por Helyer y Howie en 1963. La enfermedad autoinmune que desarrollan es semejante al LEG, se caracteriza por glomerulonefritis progresiva y letal asociada con anticuerpos anti ssDNA, anti-ds-DNA y otros anticuerpos antinucleares. En los ratones NZB/W los estrógenos catalizan las manifestaciones de la enfermedad, pues las hembras la desarrollan tempranamente y con mayor severidad. Al igual que en los ratones NZB, las células afectadas son los precursores de médula ósea (77).

**c) MRL:** Los ratones de la cepa MRL también desarrollan una enfermedad semejante al LEG, que se anticipa en presencia de la mutación del gene *lpr* (linfoproliferativa). La mutación *lpr* agudiza el padecimiento, pues afecta a diferentes células hematopoyéticas. Así pues, los ratones MRL/*lpr-lpr* presentan glomerulonefritis, vasculitis, artritis, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia y niveles elevados de autoanticuerpos. Esta mutación es responsable de la aparición de un gran número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> en órganos linfoides periféricos. Algunos años después de que se describió el fenotipo *lpr*, se encontró que la mutación de este gene codifica para una molécula Fas no funcional. Actualmente se sabe que Fas es una proteína importante en la apoptosis inducida por activación celular (78). Al introducir la mutación *lpr* en otras cepas, se induce enfermedad autoinmune, cuya severidad depende del contexto genético. Una de las cepas mejor estudiadas es la C57BL/6/*lpr-lpr*, que manifiesta la enfermedad autoinmune con menos severidad que la cepa MRL/*lpr-lpr*.

**d) Síndrome de linfadenopatía generalizada:** El gene *gld* codifica para el ligando de la molécula Fas. La mutación *gld*, causa un padecimiento casi idéntico al originado por la mutación *lpr* (39).

e) **BXSB**: Otro modelo animal de LEG es el padecimiento que presentan los ratones de la cepa BXSB. En este caso el factor predisponente está vinculado al cromosoma Y. La enfermedad puede inducirse en hembras mediante la transferencia de células provenientes de bazo o médula ósea de ratones afectados (80).

En los modelos antes mencionados, el contexto genético de cada cepa es determinante en las manifestaciones de la enfermedad, pues al igual que en humanos, se trata de un padecimiento multigénico (81).

**f) Algunos de los modelos transgénicos de enfermedad autoinmune son:**

<b>Transgene expresado</b>	<b>Cepa</b>	<b>Referencia</b>
Anticuerpos anti-eritrocito	C57BL/6	(82)
Anticuerpos anti-DNA	C57BL/6	(83)
Anticuerpos anti-H-2K <sup>k</sup>	BALB/c	(84)
Anticuerpos anti-lisozima	C57BL/6	(85)
TCR- alfa-beta contra H-Y	C57BL/6	(86)
TCR-gamma-delta contra &L <sup>p</sup>	CBA/J x C57BL/6	(87)
<i>bcl-2</i>	C57BL/6 -E $\mu$ - <i>bcl-2-22</i>	(88)

### **Objetivos Parte I**

-Estudiar la participación de Fas y Bcl-2 en la regulación de la apoptosis de linfocitos B en modelos animales de LEG.

-Analizar la posible relación entre los mecanismos de selección de linfocitos B y la manifestación de enfermedad autoinmune en estos ratones.

### **Objetivos Parte II**

-Analizar los niveles de RNAm de genes reguladores de muerte celular programada y proliferación en médula ósea de pacientes con LEG.

-Correlacionar la actividad de la enfermedad con los niveles de RNAm detectados en médula ósea de los pacientes.

- Estudiar la posible participación de estos genes en la susceptibilidad al LEG.

## Hipotesis

-La expresión anormal de Fas y Bcl-2 en modelos animales de LEG podría interferir con la muerte celular inducida mediante diversos estímulos (dexametasona, choque térmico y radiación) *in vitro*.

-La resistencia a la muerte celular de linfocitos *in vitro*, podría ser un reflejo de la muerte fisiológica que ocurre *in vivo* en los ratones con enfermedad autoinmune.

-Las deficiencias en la apoptosis en las células de estos ratones podrían permitir la sobrevivencia de linfocitos autorreactivos, mismos que favorecerían la manifestación de enfermedad autoinmune.

-Los niveles de RNAm de algunos genes reguladores de apoptosis y proliferación celular podrían ser anormales en la médula ósea de pacientes con LEG.

-La expresión anormal de estos genes en la médula ósea de los pacientes, podría explicar la presencia de los linfocitos autorreactivos que se han encontrado en centros linfoides secundarios y sangre periférica de estos individuos.

## **Parte I**

### **Participación de Fas y Bcl-2 en la apoptosis de linfocitos B.**

Trabajo realizado en el Departamento de Inmunología de la Universidad de Estocolmo, bajo la asesoría de la Dra. Carmen Fernández (1993-1995).

# Participation of the Bcl-2 and Fas molecules in experimental apoptosis of spleen B lymphocytes

\*Claudia Alvarado  
\*\*Marta E. Alarcón-Riquelme  
\*Jorge Alcocer-Varela  
\*\*\*Carmen Fernández

## Abstract

**Background.** Homeostasis in the immune system is based on equilibrium between rates of cell renewal and cell death. Failure of elimination of undesirable autoreactive B cell clones may lead to autoimmune disorders. **Objective.** To assess the participation of the Bcl-2 and Fas molecules in the regulation of B lymphocyte death. **Methods.** We used two strains of mice known to have deficient mechanisms of apoptosis, namely the transgenic C57BL/6- $\text{E}\mu$ -*bcl-2-22* expressing the *bcl-2* transgene on B cells, and the C57BL/6-*lpr/lpr* mutant, lacking the expression of a functional Fas molecule. Both strains develop a systemic lupus erythematosus-like disease with serum autoantibodies and splenomegaly. We induced apoptosis by three different treatments: dexamethasone,  $\gamma$  irradiation and hyperthermia. The proportion of cells in apoptosis was determined with the TUNEL method. **Results.** Radiation or hyperthermia induced apoptosis was inhibited more effectively by having the *lpr* mutation than the proto-oncogene *bcl-2*, but the latter conferred higher resistance to apoptosis by dexamethasone. **Conclusions.** Our findings suggest that the role of molecules regulating cell death may relate to the stimuli used to induce apoptosis, and that both the *lpr* mutation and the overexpression of the proto-oncogene *bcl-2* protect B cells from apoptosis induced by the three treatments tested.

**Keywords.** Apoptosis. B lymphocytes. Bcl-2. Fas. Systemic lupus erythematosus.

## Resumen

**Antecedentes.** La homeostasis en el sistema inmune está basada en el equilibrio entre la generación de células y la muerte celular. Las fallas en los mecanismos para la eliminación de clonas B autoreactivas pueden contribuir a la generación de enfermedades autoinmunes. **Objetivo.** Estudiar la participación de Bcl-2 y Fas en la regulación de la muerte celular de linfocitos B. **Métodos.** Usamos dos cepas de ratones caracterizadas por tener mecanismos deficientes de apoptosis: 1) ratones transgénicos C57BL/6- $\text{E}\mu$ -*bcl-2-22* que expresan el oncogen *bcl-2* en las células B; 2) mutantes C56BL/6-*lpr/lpr* que son incapaces de expresar una molécula Fas funcional. Ambas cepas desarrollan una enfermedad autoinmune similar al lupus eritematoso generalizado. Como control normal empleamos ratones de la cepa C57BL/6. Se indujo la apoptosis mediante tres diferentes tratamientos: dexametasona, choque térmico,

\* Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.

\*\* Department of Genetics, BMC. Uppsala University. Uppsala, Sweden.

\*\*\* Department of Immunology, Stockholm University, Stockholm, Sweden.

This study was supported by grants from the Swedish Institute, the Universidad Nacional Autónoma de México, the Swedish Cancer Society, the Konung Gustaf V:s 80-årsfond and The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (3652-M), México.

Correspondence to: Claudia Alvarado. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Tlalpan 14000. México D.F. Telephone: (525) 6 55 59 54 Fax: (525) 573 20 96

Recibido el 3 de diciembre de 1996 y aceptado el 20 de febrero de 1997.

y radiación. El número de células en apoptosis se midió con el método TUNEL. **Resultados.** Los porcentos ( $\pm$  DE) de células en apoptosis inducida fueron  $13.5 \pm 2.6\%$ ;  $6.0 \pm 1.9\%$ , y  $5.4 \pm 1.4\%$ ; para las cepas C57BL/6, C57BL/6-*lpr/lpr* y C57BL/6- $\text{E}\mu$ -*bcl-2-22* respectivamente. La mutación *lpr* fue más efectiva que el *bcl-2* para inhibir la apoptosis inducida por radiación y por hipertermia pero lo contrario ocurrió en la apoptosis por dexametasona. **Conclusión.** Nuestros resultados muestran que mutación *lpr* y la sobre-expresión del oncogén *bcl-2* confieren resistencia a la apoptosis inducida por los tratamientos estudiados.

**Palabras clave.** Apoptosis. Linfocitos B. Bcl-2. Fas. Lupus eritematoso generalizado.

## Introduction

The elimination of undesirable T and B lymphocytes is an essential part in lymphocyte development and in shaping the antigen specific immune repertoire. The physiological manner in which these cells die is called programmed cell death (PCD). Apoptosis is one form of PCD in which the Bcl-2 and Fas molecules play important roles.<sup>1</sup>

Fas is identical to the human cell surface molecule APO-1 (designated CD95). In a cell expressing Fas either naturally or by transfection, cross-linking of this molecule by specific antibodies has been shown to induce apoptosis.<sup>2</sup> Homozygous *lpr* mice express no detectable Fas mRNA.<sup>3</sup> At cellular level, this deficiency is characterized by the progressive accumulation of large numbers of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> Thy<sup>+</sup> lymphocytes that infiltrate the spleen and lymph nodes, and by polyclonal B cell activation occurring early in life, as judged by increased numbers of anti-hapten antibody-forming cells<sup>4</sup> and by deficient B cell tolerance to haptenated foreign immunoglobulin.<sup>5</sup> B cells from the *lpr* mouse overexpress class II MHC molecules.<sup>6</sup> C57BL/6-*lpr/lpr* mice develop splenomegaly and have high serum levels of rheumatoid factor, but the *lpr* mutation may also promote generation of multiple other autoantibodies. Manifestations of the disease are related to the genetic background<sup>7</sup> and tend to progress with age. Bcl-2 is located in mitochondria, and has an apoptosis blocking role.<sup>8</sup> Transgenic mice overexpressing this molecule have higher numbers of B lymphocytes, due to their increased longevity, and not to an elevated rate of division.<sup>9</sup> The antibody responses in these animals are prolonged,<sup>10</sup> which could be one of the reasons why these transgenic mice eventually develop an autoimmune disease resembling SLE, even when they express the transgene only in the B cell compartment. In this study we aimed to test the role of Fas and Bcl-2 in the apoptotic process of B

lymphocytes by using the C57BL/6- $\text{E}\mu$ -*bcl-2-22* mouse strain which overexpresses the Bcl-2 molecule on B cells, and the C57BL/6-*lpr/lpr* mutant, which presents abnormalities of both T and B lymphocytes. Apoptosis was induced by hipertermia, by dexametasone (DM) or by  $\gamma$  irradiation.<sup>11-14</sup>

## Material and Methods

**Animals.** As healthy controls we used C57BL/6 mice. The C57BL/6-*lpr-lpr* strain mice (B6MRL-*lpr-lpr* Ch<sup>b</sup>) were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbour ME USA). The C57BL/6- $\text{E}\mu$ -*bcl-2-22* in which the *bcl-2* transgene was introduced in the C57BL/6 genetic background, were kindly provided by Dr. Alan Harris (Walter & Eliza Hall Institute, Melbourne, Australia). The transgene in these mice is preferentially expressed in B cells since it is under the influence of the IgM promoter element ( $\text{E}\mu$ ).<sup>10</sup> The presence of the transgene was assessed by PCR amplification of genomic DNA extracted from the tail.<sup>15</sup> The amplified sequences corresponded to the SV40 early region promoter of the lymphoid expression vector carrying the transgene.<sup>16</sup>

**Cell cultures.** Single cell suspensions were prepared from 12-14 weeks old mice by mincing their spleens under sterile conditions. Cells were washed with Earle's balanced salt solution (Gibco BRL, Paisley UK) and resuspended in RPMI 1640 (Gibco BRL, UK) supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/mL penicillin-streptomycin. Viability at the time of initial plating was greater than 95% as determined by trypan blue dye exclusion. Cells were plated in triplicate at a density of  $4 \times 10^5$  mononuclear splenocytes/mL in a volume of 0.2 mL in 96 well culture plates (Costar, Cambridge MA USA). Cultures were maintained for 72 h in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. When B cell responses were tested, lipopolysaccharide (LPS) (extracted from E coli 0.55:B5, Dept. of Bacteriology, Karolinska Institute, Stockholm Sweden) was added at

a final concentration of 25 µg/mL. To study T cell responses concanavalin A (Con A) was added at a final concentration of 5 µg/mL (Pharmacia, Uppsala Sweden).

**<sup>3</sup>H-thymidine incorporation.** Resistance to cell death promoted by the damaging agents was determined by the proliferative capacity of the treated cells. Cells were cultured for 72 h and <sup>3</sup>H-thymidine was added at a final concentration of 2x10<sup>6</sup> Ci/mL 18 hrs prior to termination of the cultures. The cells were harvested using a Skatron cell harvester, and cell proliferation was assessed in a Rack-Beta scintillation counter (LKB, Sweden). Results were expressed as mean counts per minute (cpm) of triplicate cultures.

**Induction of apoptosis.** To test the induction of apoptosis by DM treatment we cultured B lymphocytes in the absence or presence of DM 10<sup>-10</sup> M to 10<sup>-4</sup> M (SIGMA, St Louis MO USA) 4 hours before adding LPS. For γ irradiation induced apoptosis, we irradiated mice with various doses (0-700 cGy) under a source of <sup>137</sup>Cs. Spleens were removed 4 hours later and cells were plated in the presence of LPS or Con A. To induce apoptosis by mild hyperthermia, we incubated cells of the various mice strains at 43 °C in RPMI for 5,10,15,20,25 or 30 min. We then plated the cells in the presence of LPS 4 hours after heating. All experiments were performed in triplicate. Their mean values were used to determine the mean ± SD for each group.

**Determination of resistance to cell death.** At first we determined resistance to apoptosis promoted by each of the aforementioned treatments by using trypan blue cell exclusion. This method was not sensitive enough as the cells cultured without stimulation normally die after some hours. To increase the sensitivity of the method used to estimate the resistance to cell death, we used LPS and Con A to expand the viable B and T lymphocytes, respectively. A kinetic curve of proliferation in presence of LPS or Con A was performed. The optimal time for detection of proliferation was 72 hours. Resistance to cell death was then expressed as the % viability after the various treatments using the following formula: % viability = (cpm of treated cells/cpm of non treated cells) x 100

**Identification of apoptotic cells.** In order to show that the cells were dying through PCD, and LPS was not interfering in this process, we measured apoptosis before and after induction of apoptosis with heat shock. Spleen cells were isolated as mentioned above. The cells were heated at 43 °C in RPMI for 30

min and then were incubated for 0, 2, 4, 6, 8 or 24 h at 37 °C in the presence or absence of LPS (30 µg/mL). The cells were subsequently washed three times with BSS, and cytospun at 500 rpm for 5 min. Cells were fixed on glass slides with 3% formaldehyde in BSS.

Apoptosis was determined by the method of TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL).<sup>17</sup> Endogenous peroxidase was inactivated by covering the sections with 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min at room temperature (RT). The slides were rinsed with PBS three times and immersed in TdT buffer (30mM Trizma base pH = 7.2, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM cobalt chloride). The sections were added TdT 0.3 e.u./µL (Oncor Apop Tag, Dakopatts, Stockholm) and digoxigenin-dUTP and incubated in a humidified chamber at 37 °C for 60 min. The reaction was ended by transferring the slides to TB buffer (300 mM sodium chloride, 30 mM sodium citrate) for 30 min at RT. After washing the slides three times in PBS for 5 min, the sections were covered with anti-digoxigenin antibody conjugated with peroxidase and incubated with a plastic coverslip in a humidified chamber for 30 min at RT. The slides were then washed with PBS three times for 5 min, and peroxidase substrate 3'3-diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, USA) was prepared according to the manufacturer's instructions. Substrate solution (30 µL) was added to each field for incubation during 10 min in darkness and at RT. The slides were washed in distilled water, dipped for 10 seconds into hematoxylin and then rinsed with distilled water; they were then left to dry and mounted in buffered glycerol.

The staining pattern for apoptotic cells provides both morphology and sensitivity comparable to the Giemsa stain. The apoptotic cells were examined with a Polyvar 2 microscope (Reichert-Jung, Vienna Austria) equipped with a 3CCD color camera (Sony Corporation, Tokyo, Japan). The cells were enumerated by setting the color and morphology of the hematoxylin counterstained cells as a standard. Four hundred cells were counted per sample. Apoptotic cells were expressed as the percent of total cells.

**Statistics.** Statistical analysis was performed by using Mann-Whitney's two-sample rank sum test. A two way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the different treatments for induction of apoptosis in the various strains of mice. Differences were considered significant if p ≤ 0.05.



## Results

**Role of Fas and Bcl-2 in the apoptosis induced by  $\gamma$  irradiation in spleen lymphocytes.** B cells from *lpr* mutants exhibited a marked resistance to irradiation induced apoptosis as compared to controls ( $p < 0.01$ ). We observed 50% viability following approximately 620 cGy, while B cells from the normal strain required only 440 cGy for the same effect. The overexpression of *bcl-2* conferred somewhat less resistance to this treatment, since 50% viability was observed with approximately 500 cGy (Fig. 1). Fifty percent viability of T cells in the *lpr* and normal mouse strains was observed with 600 and 460 cGy respectively (Fig. 2). These results indicate that the *lpr* mutation increases B and T lymphocyte resistance to  $\gamma$  irradiation. As expected, no significant resistance to this treatment was observed in T lymphocytes from *bcl-2* transgenic mice. Inasmuch as the transgene is selectively expressed in B cells, this finding indicates that the experimental conditions used here are suitable for the study of apoptosis.

**Role of Fas and Bcl-2 in the apoptosis induced by DM in B lymphocytes.** B lymphocytes from *bcl-2* transgenic mice presented higher resistance to DM-

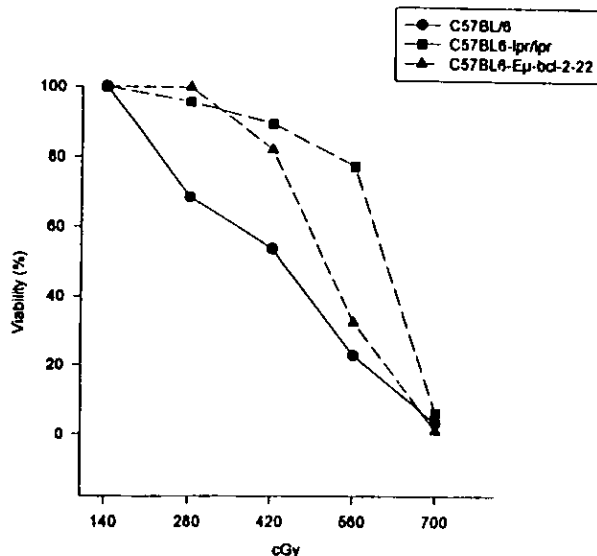


Fig. 1. Viability of splenic B lymphocytes from mice treated with  $\gamma$  irradiation. Animals of the C57BL/6, C57BL/6-*lpr/lpr* and C57BL/6-*Eu-bcl-2-22* strains were irradiated. Spleen cells were isolated and cultured for 72 h in the presence of LPS 30  $\mu$ g/mL. Viability was assessed by  $^3$ H-thymidine uptake during the last 18 h. The curves show the mean values of three experiments.

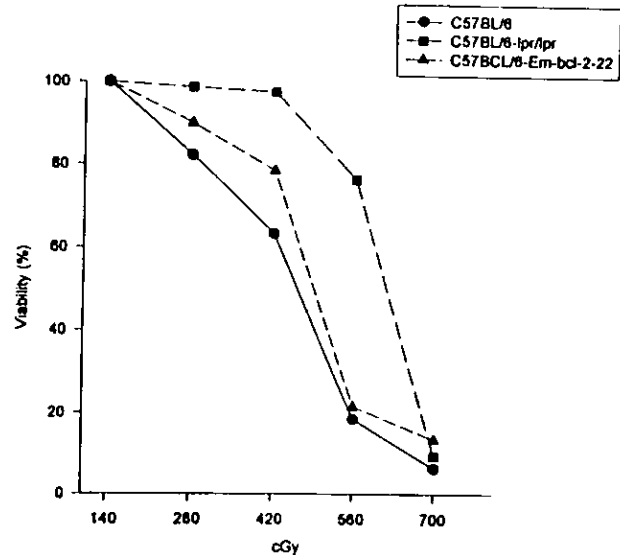


Fig. 2. Viability of spleen T lymphocytes from mice treated with  $\gamma$  irradiation. Animals of the C57BL/6 and C57BL/6-*lpr/lpr* strains; or C57BL/6 and C57BL/6-*Eu-bcl-2-22* strains were irradiated. Splenic cells were isolated and cultured for 72 h in the presence of 5  $\mu$ g/mL of Con A. Viability was assessed by  $^3$ H-thymidine uptake during the last 18 hrs. The curves show the mean values of three experiments.

induced apoptosis than B cells from control mice ( $p < 0.01$ ). Cells with the *lpr* mutation were also resistant to this treatment ( $p < 0.05$ ). Fifty per cent viabilities for cells from the C57BL/6, C57BL/6-*lpr/lpr* and the *bcl-2* transgenic mice were observed at DM concentrations of  $6.3 \times 10^{-10}$  M,  $1.6 \times 10^{-8}$  M and  $7 \times 10^{-8}$  M, respectively (Fig 3). Thus, the overexpression of the proto-oncogene *bcl-2* and the *lpr* mutation protect against B lymphocyte apoptosis induced by DM.

**Role of Bcl-2 and Fas in the apoptosis of B lymphocytes induced by mild hyperthermia.** The overexpression of *bcl-2* and the *lpr* mutation on B cells was found to confer partial resistance to the apoptosis induced by mild hyperthermia. The *bcl-2* molecule, however, was found to be less efficient ( $P < 0.01$  and 0.05 respectively) (Fig. 4).

**Determination of apoptotic cells.** A kinetic curve of incubation in presence and absence of LPS after heat treatment was constructed. The optimal time for detection of apoptosis was found to be 4 h, so subsequent studies were performed at this time. Comparison of results obtained from six experiments revealed no significant difference in the number of cells undergoing spontaneous apoptosis in freshly spleen cells from C57BL/6, C57BL/6-*lpr/lpr* and

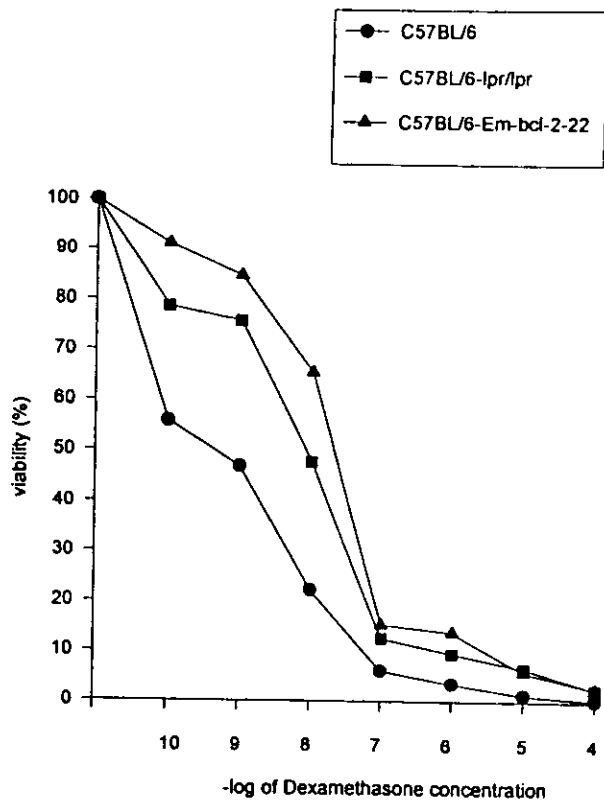


Fig. 3. Viability of isolated spleen cells treated with dexamethasone. Spleen cells were isolated from animals of the C57BL/6, C57BL/6-*lpr/lpr* and C57BL/6-*Em-bcl-2-22* strains. The cells were cultured for 72 h in presence of DM and LPS 30  $\mu$ g/mL. Viability was assessed by  $^3$ H-thymidine uptake during the last 18 h. The curves show mean values of three experiments.

C57BL/6-*Em-bcl-2-22*. We found a significant difference in the number of cells undergoing apoptosis in the cell populations treated with heat (table 1). These results indicate that cells bearing the *lpr* mutation or the *bcl-2* proto-oncogene are resistant to heat-induced apoptosis. The capacity of entering a program of cell death was not significantly affected by addition of LPS (Fig 5).

## Discussion

The resistance of B cells to apoptosis induced by damaging treatments was determined by measuring the capacity of B cells to proliferate after stimulation with LPS. This method was selected because it provides a sensitive analysis. That this method is suitable for the study of apoptosis was demonstrated by the behaviour of T cells from the C57BL/6-*Em-bcl-2-22* mice. The Bcl-2 molecule is expressed in this

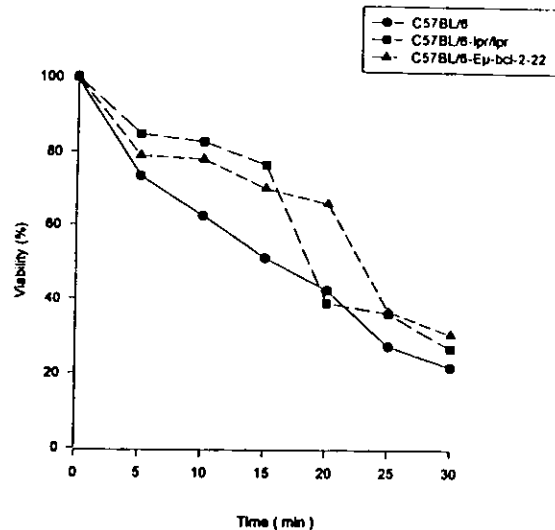


Fig. 4. Viability of isolated spleen cells incubated 43 °C. Spleen cells were isolated from animals of the C57BL/6, C57BL/6-*lpr/lpr* and C57BL/6-*Em-bcl-2-22* strains. Following incubation 43 °C in RPMI cells were cultured for 72 h in the presence of LPS. Viability was assessed by  $^3$ H-thymidine uptake during the last 18 h. The curves show mean values of three experiments.

mouse strain only in the B cell compartment. The present work shows that T cells from these mice are not protected against cell death, displaying a curve with a slope similar to that observed for T cells from normal unprotected animals. The larger number of B lymphocytes from *bcl-2* transgenic mice and *lpr* mutants found in cell cultures after the damaging treatments is probably due to increased survival of these cells and not to an artifact due to a higher capacity of proliferation, since B cells bearing the *lpr* mutation have normal LPS responses.<sup>18</sup> The same is true for the B lymphocytes derived from the *bcl-2* transgenic mice, since this molecule prevents cell death but does not promote cell proliferation.<sup>9</sup>

A correlation was found between the data reported as cell viability and the number of apoptotic cells detected with the TUNEL method. The assessment of apoptosis with the TUNEL method confirmed that LPS does not interfere with apoptosis in our system, since the frequencies of apoptosis were not significantly altered by its presence.

Our results show that the *lpr* mutation and the overexpression of *bcl-2* confer partial resistance to cell death in B cells subjected to all treatments. When apoptosis was induced with  $\gamma$  irradiation and heat

Table 1. Apoptosis (%) of cells induced by hyperthermia in spleen B lymphocytes.

No. of experiment	Heat shock <sup>a</sup>			Heat shock with LPS			Without heat shock		
	C57BL/6	C57BL/6 <i>-lpr/lpr</i>	C57BL/6 <i>-Eμ-bcl-2-22</i>	C57BL/6	C57BL/6 <i>-lpr/lpr</i>	C57BL/6 <i>-Eμ-bcl-2-22</i>	C57BL/6	C57BL/6 <i>-lpr/lpr</i>	C57BL/6 <i>-Eμ-bcl-2-22</i>
1	20	6½	12½	19	14	11½	1	0	1½
2	9½	3	3	7½	2½	3½	0	0	1
3	8½	3	1½	8	2½	1½	3	2	1
4	8	4	4	7½	3½	4½	2½	1½	1½
5	19½	8	9	20	10	7	1½	1	1
6	18½	4	5	19	4	4½	1½	1½	0½
Mean ± SEM	14 ± 2	4.7 ± 0.8*	5.8 ± 1.7*	13.5 ± 2.6	6.0 ± 1.9*	5.4 ± 1.4*	1.5 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.1

<sup>a</sup> Spleen cells were isolated from mouse strains. For heat shock the cells were heated at 43 °C in RPMI for 30 min, and then incubated for 4 h at 37 °C. Cells were fixed in glass slides and apoptosis was assessed with the TUNEL method. Four hundred cells were counted per sample, and the frequencies of apoptotic cells are expressed as the percent of total cells.

\*  $p < 0.01$  when compared to controls (Mann Whitney rank sum test).

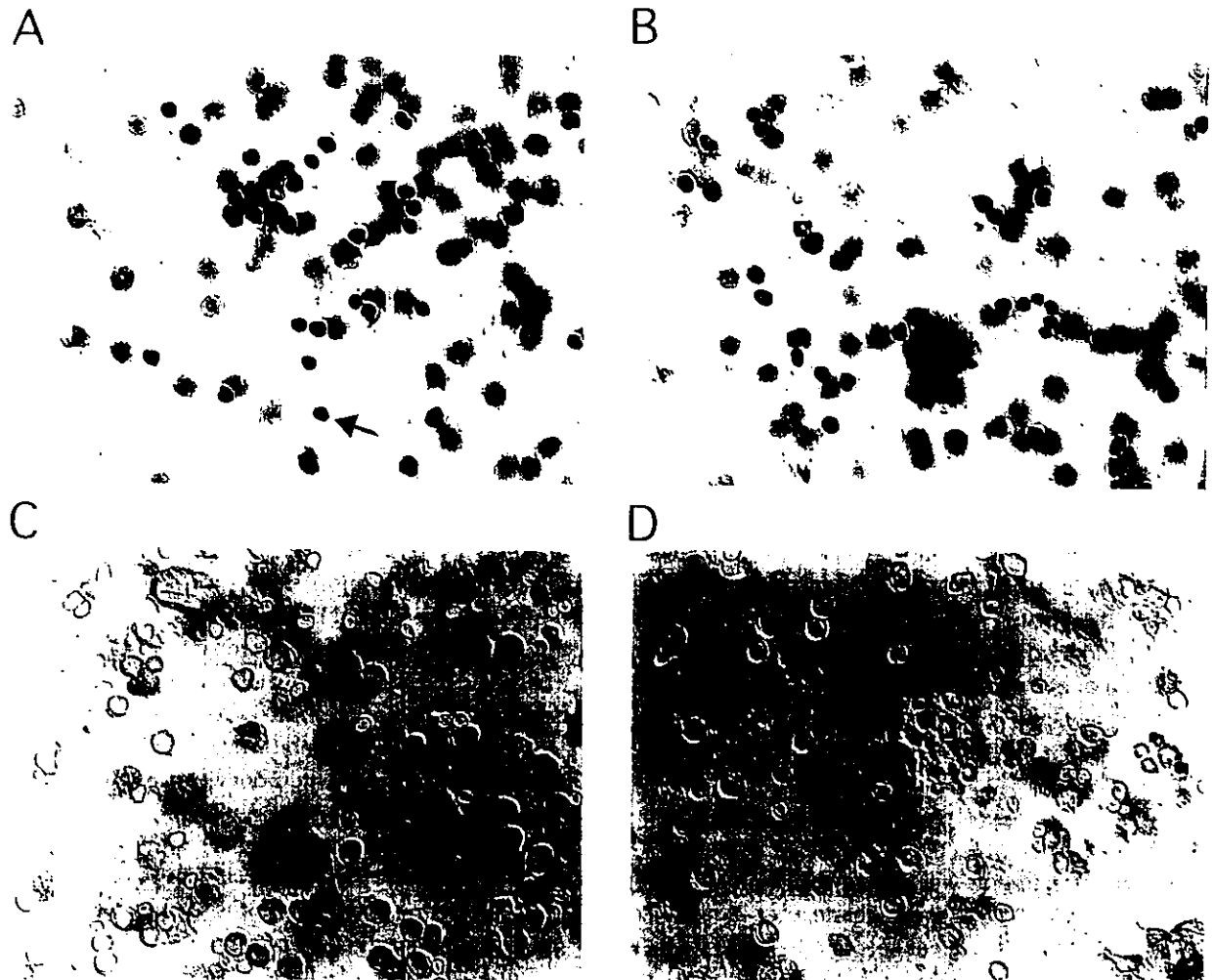


Fig. 5. Apoptosis induced by hyperthermia in spleen B lymphocytes. Cells were heated at 43 °C in RPMI for 30 min and incubated for 4 h at 37 °C. Spleen cells from C57BL/6 incubated without LPS (5A) or with LPS (5B), and spleen cells from C57BL/6-*lpr/lpr* incubated without LPS (5C) or with LPS (5D) were stained with the TUNEL method. The arrow shows an apoptotic cell.

shock, the *lpr* mutation inhibited apoptosis more effectively than the proto-oncogene *bcl-2*. The opposite was observed in cells treated with DM. Our findings suggest that these molecules regulate cell death according to the stimuli used to induce apoptosis. Ionizing irradiation differs from glucocorticoids in causing immediate DNA-strand breaks, which are mainly single-strand nicks that are repaired within one hour.<sup>13</sup> Since these agents damage DNA in different ways, they probably represent alternative pathways to cell death. Whether *bcl-2* and *lpr* play a relevant role in some pathways of cell death but not in others remains to be elucidated. Studies of the implications of the *bcl-2* proto-oncogene in the regulation of apoptosis show that, depending on the cell lineage, both *bcl-2* sensitive and resistant mechanisms are present.<sup>19</sup>

Increased resistance to cell death of spleen B lymphocytes from the C57BL/6-*lpr/lpr* and the C56BL/6- $\epsilon\mu$  *bcl-2-22* strains probably results from the inability of these cells to undergo apoptosis in response to the damaging stimuli. These results suggest that B cells carrying the *lpr* mutation or the *bcl-2* proto-oncogene may also have defective apoptosis to physiological stimuli. Cellular abnormalities in entering apoptosis may result in survival of abnormal or undesirable cells with resulting selection and/or expansion of autoreactive clones in autoimmune disorders, or persistence of cells with aberrant mutations in cancer.

These results, together with previous studies<sup>20</sup> show that B lymphocytes carrying the *lpr* mutation have an intrinsic abnormality that could relate to the autoimmune manifestations in the *lpr* model.<sup>21</sup> There is also evidence that B cell defects could be primarily responsible for autoimmune disease.<sup>22</sup> Thus, pre-B-cell clones derived from lupus prone (NZB x NZW) F1 mice, but not from normal mice, could differentiate in severe combined immunodeficient (SCID) mice and secrete high titers of anti-nuclear antibodies. Moreover, in a subset of recipients these cells gave rise to lupus-like autoimmune disease in the apparent absence of T cells. In another study in the SCID mice model injected with mononuclear cells from lupus patients the autocrine production of IL-10 by B cells seemed to be primarily responsible of anti-DNA autoantibody production.<sup>23</sup>

Although the *in vivo* significance of these findings is unknown, it is possible that apoptosis, at the level of B lymphocytes, could play a regulatory role in the responses of auto-reactive cells.

There is substantial information showing that dysregulation of programmed cell death can be harmful, resulting in either autoimmune disease or immune incompetence. Recent reports show a correlation between the extent of apoptosis and the degree of clinical activity in patients with SLE.<sup>24</sup>

### Acknowledgments

We thank Gunnel Jansson for her expertise with care of the animals and breeding. We are grateful to Donato Alarcón-Segovia and Eva Sverremark for critical review of the manuscript.

### References

1. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14:126-30.
2. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh S, Yonehara S, Copeland N, Jenkins NA, et al. The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; 148:1274-9.
3. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland N, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356:314-7.
4. Klinmann D, Steinberg AD. Systemic autoimmune disease arises from polyclonal B cell activation. *J Exp Med* 1987; 165:1755-60.
5. Goldings EA. Defective B cell tolerance induction in New Zealand black mice I. Macrophage independence and comparison with other autoimmune strains. *J Immunol* 1993; 151:2630-4.
6. Monroe JG, Cambier JC, Mody EA, Pisetsky DS. Hyper-Ia antigen expression on B cells from B6-*lpr/lpr* mice correlates with manifestations of the autoimmune state. *Immunopathology* 1985; 34:124-9.
7. Kelley VE, Roths JB. Interaction of mutant *lpr* gene with background strain influences renal disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 37:220-9.
8. Korsmeyer SJ. *bcl-2* initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80:879-86.
9. Mc Donnell TJ, Núñez G, Platt FM, Hockenberry D. Deregulated *bcl-2* immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B cell population. *Mol Cell Biol* 1990; 10:1901.
10. Strasser AS, Whittingham DL, Vaux ML, Bath JM, Adams Cory S, et al. Enforced *bcl-2* expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:861-5.
11. Tsujimoto Y. Stress-resistance conferred by high level of *bcl-2a* protein in human B lymphoid cell. *Oncogene* 1989; 4:1331-6.
12. Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanj. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 1991; 51:1078-85.
13. Lowe SW, Schmitt EM, Osborne T. Jacks. p53 is required for radiation induced apoptosis mouse in thymocytes. *Nature* 1993; 362:847-9.
14. Takano Y, Harmon BV, Kerr HJ. Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumor cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J Pathol* 1991; 163:329-36.

15. Molecular Biology Unit, WEHI. May 1992.
16. Rosenbawm H, Harris AW, Bath ML, Mc Neal J, Webb E, Adams JM, et al. An Em-v-abl transgene elicits plasmacytomas in concert with an activated *myc* gene. *EMBO J* 1990; 9:897-905.
17. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501.
18. Warren W, Roths JB, Murphy ED, Pisetsky DS. Mechanisms of polyclonal B cell activation in autoimmune B6/*lpr/lpr* mice. *Cell Immunol* 1984; 84:22-31.
19. Cuende E, Alés-Martín JE, Ding L, González-García M, Martínez MC, Núñez G. Programmed cell death by *bcl-2* dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J* 1993; 12:1555-60.
20. Alarcón-Riquelme ME, Fernández C. Expression of the B cell repertoire in *lpr* mice; abnormal expansion of a few V<sub>H</sub>J558 germ line genes. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:262-8.
21. Sobel E, Katagiri T, Katagiri K, Morris SC, Cohen PL, Eisenberg RA. An intrinsic B cell defect is required for the production of autoantibodies in the *lpr* model of murine systemic autoimmunity. *J Exp Med* 1991; 173:1441-9.
22. Reininger L, Radaszkiewicz T, Kosco M, Melchers F, Rolink AG. Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long term in vitro proliferating (NZB x NZW) F1 pre B cells. *J Exp Med* 1992; 176:1343-53.
23. Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, et al. Role of interleukin 10 in B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1995; 181:839-44.
24. Emlen W, Niebur JA, Kadera R. Accelerated apoptosis of lymphocytes from patients with SLE. *J Immunol* 1994; 152:3685-92.

## **Parte II**

**Anormalidades en la expresión genética de TNF-alfa y genes  
reguladores de proliferación y muerte celular en médula ósea  
de pacientes con Lupus eritematoso generalizado.**

Trabajo realizado en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán bajo la asesoría del Dr. Jorge Alcocer Varela y del Dr. Luis Llorente Peters (1995-1997).

# Differential Oncogene and TNF- $\alpha$ mRNA Expression in Bone Marrow Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients

C. ALVARADO-DE LA BARRERA, J. ALCOCER-VARELA, Y. RICHAUD-PATIN,  
D. ALARCÓN-SEGOVIA & L. LLORENTE

Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico

Received 16 March 1998; Accepted in revised form 24 June 1998

Alvarado-de la Barrera C, Alcocer-Varela J, Richaud-Patin Y, Alarcón-Segovia D, Llorente L. Differential Oncogene and TNF- $\alpha$  MRNA Expression in Bone Marrow Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients. Scand J Immunol 1998;48:000-000

The aim of the study was to investigate the bone marrow expression of genes involved in cell growth and apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Spontaneous expression of *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, p53, Fas and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  by bone marrow cells was measured using either semiquantitative or quantitative reverse transcription polymerase chain reaction in SLE patients ( $n = 8$ ) and in eight normal control subjects. The expression of *bcl-2* was found to be higher in SLE patients than in controls. Bone marrow cells from SLE patients showed significant down-regulation of *bax*, *c-myc*, *c-fos* and p53 ( $P \leq 0.05$ ), as compared to normal controls. In both SLE patients and controls the expression of *c-jun* and Fas was very low or undetectable. Finally, TNF- $\alpha$  gene expression was higher in bone marrow samples from SLE patients than in those of controls ( $P = 0.01$ ). The abnormal expression of genes regulating cell growth and apoptosis in bone marrow cells from SLE patients may help explain the presence of autoreactive cells in secondary lymphoid organs and peripheral blood of SLE patients.

Dr Luis Llorente, Departamento de Immunología y Reumatología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, Mexico

## INTRODUCTION

Cellular activation is a complex process that may facilitate either proliferation or cell death in response to extracellular and/or intracellular stimuli. Programmed cell death, or apoptosis, has been proposed to be a critical physiological regulator of cellular differentiation. Within this context, apoptosis has been linked to ontogenesis and tissue homeostasis and is believed to play a critical role in the emergence of pathological conditions [1]. Apoptosis is regulated by a variety of signals including, among others *bcl-2*, Fas, *bax*, and p53. It is now well documented that *bcl-2* plays an important role in the control of cell survival. Gene transfer experiments in different cell types have shown that *bcl-2* expression, in particular, promotes survival by preventing apoptosis rather than by promoting cell proliferation [2, 3]. Acting as bivalent regulators, *c-myc*, *c-fos* and *c-jun* are transcription factors that can determine either cell proliferation or apoptosis depending on the presence or not of certain growth factors [4, 5]. p53 exerts an effect on the initiation of

apoptosis only when it is induced by agents that cause DNA damage [6]. In contrast, Fas and Bax directly promote apoptosis [7, 8].

Abnormal regulation of programmed cell death could play a pathogenic role in some autoimmune diseases [9]. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune rheumatic disease characterized by a broad diversity of clinical features and by the presence of autoreactive B cells that produce autoantibodies. It is now widely accepted that cytokines can enhance or suppress growth, by protecting target cells from apoptosis or by increasing their susceptibility to it. In this regard, tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is a noteworthy cytokine. On the one hand, TNF- $\alpha$  can induce the release of stimulatory cytokines, while on the other, it can suppress stem cells by inducing cytokines that inhibit haematopoiesis.

The purpose of this study was to investigate the expression of genes involved in cell growth and apoptosis in patients with SLE. We aimed then to provide an explanation for the presence of peripheral autoreactive cells, which has been recognized in this

disease, by studying the expression of these genes in freshly isolated bone marrow cells from SLE patients.

## MATERIALS AND METHODS

**Patients and controls.** Eight female patients with SLE were studied. Their ages ranged from 18 to 39 years (mean, 29). All patients fulfilled at least four of the American College of Rheumatology revised criteria for diagnosis of SLE [10]. At the time of the study, four patients were receiving less than 15 mg of prednisone per day, and two of them were also receiving daily chloroquine (150 mg and 225 mg po, respectively). Two other patients were receiving 150 mg of chloroquine and 50 mg of azathioprine, respectively, and one more patient was not receiving any drug therapy Table 1. Three patients were receiving prednisone at doses higher than 15 mg per day and two of these also received immunosuppressive treatment (methylprednisolone pulses). Clinical disease activity was scored on a 0–32-point scale according to the MEX-SLEDAI index [11]. Patients with indices greater than or equal to 2 were considered to have active disease. Accordingly, seven patients had active and one had inactive SLE at the time of the study.

In all instances bone marrow aspiration was performed in order to further evaluate the cause of haemocytopenia (platelets  $<5 \times 10^4/\text{ml}$  and/or leukocytes  $<2000/\text{mm}^3$ ). Informed consent was obtained before bone marrow aspiration in all cases. Five female and three male healthy volunteer donors for bone marrow transplantation were studied as controls. The experimental protocol was approved by the committee for medical ethics of the Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. All subjects were informed about the objectives and methods of the study and gave their consent.

**Preparation of RNA, and PCR amplification.** Bulk bone marrow cells were immediately frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until assayed. RNA was isolated from 20 million frozen cells using the Trizol technique according to the manufacturer's recommendations (Gibco-BRL, Gaithersburg, MI, USA) as previously described by Chomczynsky & Sacchi [12]. Briefly, purified RNA was treated with 10 units of DNase I-RNase free (Gibco-BRL) at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min, then with phenol and chloroform/isoamyl alcohol, and was finally precipitated with ethanol. RNA was then quantified by

measuring the optical density at 260 nm and using the Fast Check nucleic acid quantification system (Gibco-BRL). Synthesis of cDNA was performed using 1  $\mu\text{g}$  of RNA that was incubated with 50 U of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Gibco-BRL), 1 mM DTT, 1 U of RNase inhibitor (Gibco-BRL), 2.5  $\mu\text{M}$  oligo [d(T)<sub>12-18</sub>], 0.5 mM of each of the four deoxynucleotide triphosphates and 0.1 M of biotinylated (bio)-14 dATP (Gibco-BRL). The resulting cDNA was divided in aliquots for PCR amplification of the cDNA products using various sets of sense and antisense primers (Table 2), and 2 units of Taq polymerase (Gibco-BRL). We verified that the number of cycles used was sub-optimal for PCR amplification, i.e. that the plateau level for PCR product was not reached at the end of the reaction. Amplification was done at  $94^\circ\text{C}$  for 1 min;  $55^\circ\text{C}$  for 1 min; and  $72^\circ\text{C}$  for 1 min for 30 cycles. The PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels containing 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide. Negative controls included samples in which the addition of reverse transcriptase (RT) was omitted during the processing, and samples which were devoid of cDNA during the PCR reaction. Gels were photographed and transferred onto nylon photogene membranes (Gibco-BRL), and incorporation of bio-14 dATP was detected by a Photogene Nucleic Acid Detection System (Gibco-BRL). Membranes were exposed to Kodak X-OMAT-AR X-ray films (Eastman Kodak, Rochester NY, USA) for 1 min. Polaroid negatives and X-ray films were used for densitometric analysis. The specificity of each molecule tested was confirmed by Southern blot with internal specific oligonucleotides (data not shown).

**Quantitative PCR for  $\beta 2$ -microglobulin and TNF- $\alpha$ .** To quantify the mRNA for the TNF- $\alpha$  present in bone marrow cells, a known amount (0.025  $\mu\text{g}$ , 67 826 molecules) of a standard RNA was added to 1  $\mu\text{g}$  of bone marrow RNA before production of cDNA. The standard RNA was produced from plasmid pQA-1 (a gift from Dr David Shire, Sanofi Elf Bio Recherches, Labège, France) [13, 14], which contains a tandem array of primers for  $\beta 2$ -microglobulin and TNF- $\alpha$ . The standard RNA serves as an internal control for the reverse transcription reaction and permits the generation of standard curves for quantifying the specific target mRNAs. The size of the amplicon product derived from the standard RNA differs from the size of the tested sample RNA. This allows comparison of a known amount of standard RNA with the unknown amount of mRNA in the sample by densitometry. In all

Table 1. Disease activity, treatment status and gene mRNA expression in individual patients

Patient	Disease activity score <sup>a</sup>	Current treatment (mg/day) <sup>b</sup>		Gene (arbitrary units)						
		PDN	AZA or CQ	<i>bcl-2</i>	<i>bax</i>	<i>c-myc</i>	<i>c-fos</i>	<i>c-jun</i>	<i>p53</i>	TNF- $\alpha$ <sup>c</sup>
1	6	45	–	0.6	0	0	1.1		00	262.0
2	2	–	150 (CQ)	0.76	0	0	0	0	0	287.0
3	2	5	225 (CQ)	2.0	0	0	0.48	0	0	25.0
4	0	–	150 (CQ)	0.86	0	0	0.17	0	0	13.8
5	0	–	–	1.0	0	0	0	0	0	0.0
6	4	40	–	0.88	0	0.25	0	1	0.28	159.0
7	3	50	–	0.23	0	0	0	0	0.26	281.0
8	6	12.5	50 (AZA)	1.77	0	0	1.56	0	0	13.9

### MEX-SLEDAI

<sup>a</sup>PDN, prednisone; AZA, azathioprine; CQ, chloroquine.

<sup>c</sup>mRNA molecules of TNF- $\alpha$  per 50 molecules of  $\beta 2$ -microglobulin.



Table 2. Primer sequences for PCR amplification

Gene	Sense primer	Anti-sense primer	Amplicon length (bp)
<i>p53</i>	5' GCATGGGCGGCATGAACCGGAG 3'	5' GGAATTCAGGTGGCTGGAGTGAGC 3'	384
<i>c-fos</i>	5' GAGCTGACTGATACACTCCA 3'	5' GCTCTTGACAGGTTCCACTG 3'	296
<i>c-jun</i>	5' CCAAGAACGTGACAGATGAG 3'	5' AGTTGCTGAGGTTTGCCTAG 3'	296
<i>c-myc</i>	5' GCACTGGAACCTACAACACCC 3'	5' CGAGGTCATAGTTCTGTGG 3'	224
<i>bax</i>	5' ATGGACGGGTCCGGGGAG 3'	5' TCCAGTTCGTCCTCCCGAT 3'	210
Fas	5' ATGCTGGGCATCTGGACCCTCTA 3'	5' TCTGCACTTGGTATTCTGGGTCCG 3'	384
TNF- $\alpha$ *	5' ACAAGCCTGTAGCCCATGTT 3'	5' AAAGTAGACCTGCCAGACT 3'	427
<i>bcl-2</i>	5' ACGACTTCTCCCGCCGCTACC 3'	5' TCTCCCGGTTGACGCTCTCCA 3'	192
$\beta$ 2-Microglobulin*	5' CCAGCAGAGAATGGAAAGTC 3'	5' GATGCTGCTTACATGTCTCG 3'	268
Cyclophilin	5' CCG CGT CTC CTT TGA GCT GTT T 3'	5' ACCCAAAGGGAAGTGCAGCGAGAG 3'	550

\*Included in plasmid pQA-1.

samples, a standard curve (including at least four plasmid concentrations) was done for  $\beta$ 2-microglobulin and for TNF- $\alpha$ . Samples containing bone marrow cDNA and standard cDNA were amplified as mentioned above. The results were expressed as the number of mRNA molecules of TNF- $\alpha$  per 50 molecules of  $\beta$ 2-microglobulin as previously described [15]. Figure 1 shows a representative experiment for quantification of TNF- $\alpha$  mRNA.

**Semiquantification of TNF- $\alpha$ , *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *p53* and *Fas* mRNA expression.** RT-PCR for TNF- $\alpha$ , *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, *c-jun*, *p53* and *Fas* was performed as described above (without plasmid pQA-1) using 1  $\mu$ g of total bone marrow RNA. Amplification products were electrophoresed in parallel with a known amount of RNA. Results are expressed as arbitrary units (AU) for each sample, as the ratio between the molecule studied and cyclophilin band intensity detected by densitometric analysis. In order to measure more accurately the level of gene expression of TNF- $\alpha$ , the pQA-1 plasmid was used. Results from this experiment showed that the number of mRNA molecules for TNF- $\alpha$ , per microgram of total bone marrow RNA, as found by the quantitative method was comparable to that found by the semiquantitative one (data not shown).

**Statistics.** The non-parametric Mann-Whitney *U*-test was used to compare mRNA expression in bone marrow cells of the genes studied in SLE patients versus controls.

## RESULTS

### Semiquantification of *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *p53* and *Fas* in bone marrow cells

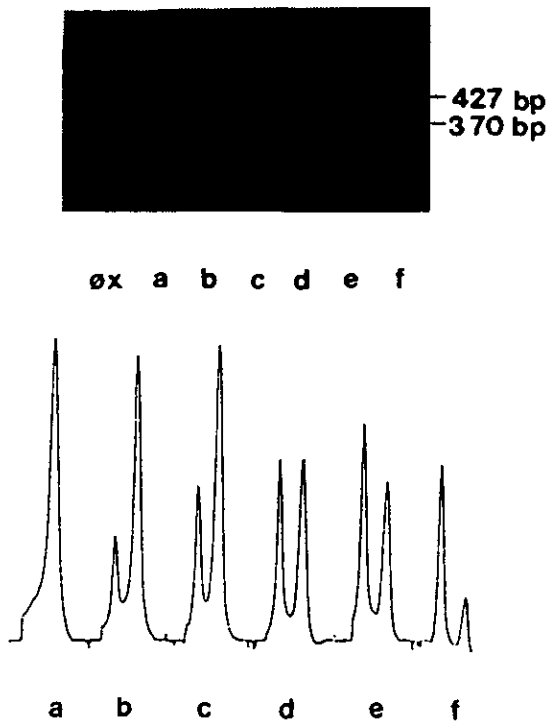
In order to rule out drug effects on gene expression, we analysed the results in two ways: first we considered the SLE patients as a single group, and secondly we classified the SLE patients into two groups (A and B) according to their regular drug treatment. Group A included one patient who was receiving no treatment, two who were receiving no prednisone but received chloroquine, and two who were receiving less than 15 mg of prednisone and also azathioprine or chloroquine. Group B included three patients who were receiving prednisone in doses higher than 15 mg per day. Statistical analysis showed no significant differences

between groups A and B for any of the genes studied ( $P > 0.5$  for all genes studied; data not shown); we thus decided to group all SLE patients together.

Spontaneous expression of the *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* and *Fas* genes was evaluated using a RT-PCR technique on freshly isolated bone marrow cells. This analysis was performed in parallel on cells from eight SLE patients and eight normal control individuals. The  $\beta$ 2-microglobulin gene expression was observed in all samples collected; thus equal amounts of initial RNA samples gave equivalent amounts of PCR product. The gene expression patterns of bone marrow cells from patient 1 and from a control are shown in Fig. 2 and Fig. 3, respectively. The increased expression of the *bcl-2* gene in SLE patients was not statistically significant ( $P = 0.16$ ), probably because of lack of statistical power. The mean values in SLE patients and controls were 1.01 and 0.60 AU, respectively (Fig. 4).

SLE patients showed decreased expression of *bax*, *c-myc*, *c-fos* and *p53* genes. The expression of the *bax* gene in SLE patients was lower than in controls (means 0.0 and 0.23 AU, respectively;  $P = 0.0002$ ). The expression of *c-myc* differed between patients and controls, (means 0.03 and 0.39 AU, respectively;  $P = 0.02$ ). The reduced expression of the *c-fos* gene in SLE patients was also apparent, since the mean value for this group was 0.4 AU, and the corresponding value for controls was 0.88 AU ( $P = 0.08$ ). There was also lower expression of the *p53* gene in SLE patients, the mean value for the latter being 0.06 AU and the value for the control group being 0.40 AU ( $P = 0.01$ ).

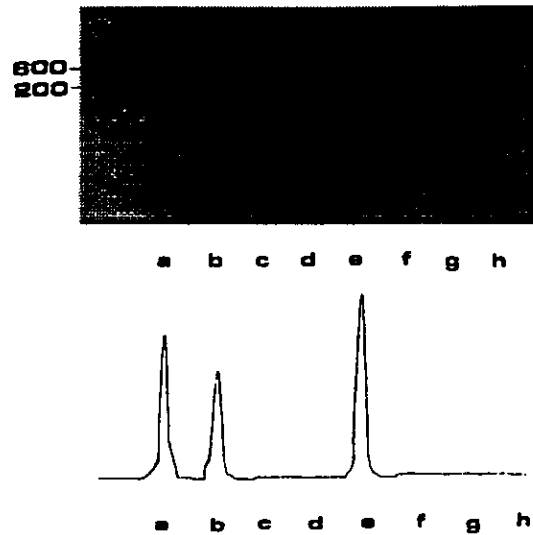
The expression of the *c-jun* and *Fas* genes was rather scarce in all the individuals studied; thus no differences were detected between the groups compared. Small amounts of the mRNA for *Fas* were found in two controls. The mean values obtained from the gene expression profile analysis according to the semiquantitative method, in bone marrow cells from SLE patients and controls, are shown in Fig. 4. Table 1 summarizes the individual patient's disease activity scores, their treatment status and oncogene and TNF- $\alpha$  mRNA expression.



**Fig. 1.** Quantification of TNF- $\alpha$  mRNA expression in bone marrow cells. The quantification procedure is shown, taking as an example the co-amplification of the cDNA from bone marrow RNA and from standard RNA for TNF- $\alpha$ . Amplified pairs products were electrophoresed through a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. The gel was photographed using Polaroid Land film 665. The upper part of the figure shows the appearance of PCR products (Polaroid negative). The 370-bp band represents the amplicons obtained with standard cDNA and the 427-bp band those from bone marrow cDNA. All lanes contained 1 ng of total bone marrow RNA, with 0.065, 0.05, 0.04, 0.025, 0.02 and 0.01 ng of standard RNA in lanes a to f, respectively. The lower part of the figure shows the densitometric scan of the Polaroid negative of the gel. The relative intensity of bone marrow amplicon/standard amplicon was calculated from each pair of bands. The ratios of bone marrow amplicon to standard amplicon were as follows: lane a, 0; lane b, 0.44; lane c, 0.6; lane d, 1.0; lane e, 1.37; lane f, 4.5. In lane d the ratio of bone marrow to standard allowed comparison of the known amount of standard RNA to the known amount of mRNA for TNF- $\alpha$ . Each TNF- $\alpha$  quantification was done with at least four plasmid concentrations. The number of molecules of TNF- $\alpha$  mRNA per nanogram of total RNA was calculated using the molecular weight of the plasmid and Avogadro's number.

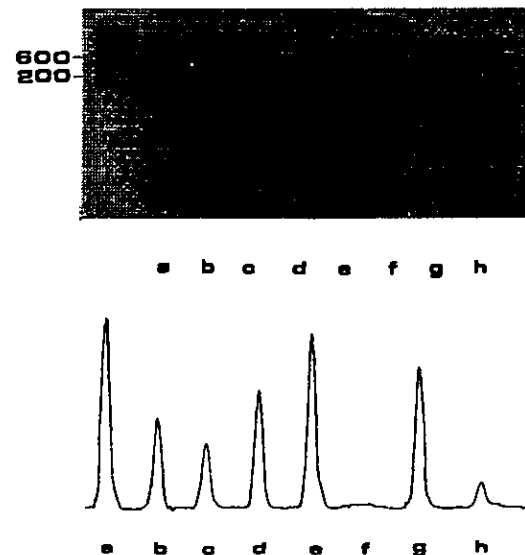
**Quantification of TNF- $\alpha$  mRNA expression**

The  $\beta$ 2-microglobulin gene expression in SLE patients was similar to that found in the control group (data not shown). However, the expression of the TNF- $\alpha$  gene in SLE patients was significantly higher than in controls ( $P = 0.01$ ). Figure 5 shows that the mRNA for this cytokine was expressed in all SLE patients except one, whereas it was detected, in small amounts, in only two healthy controls. It is of interest that the patient with



**Fig. 2.** Gene expression pattern of SLE patient 1. The upper part of the figure shows a Polaroid negative with the appearance of PCR products in 1% agarose gel containing ethidium bromide. Lane a, cyclophilin; lane b, *bcl-2*; lane c, *bax*; lane d, *c-myc*; lane e, *c-fos*; lane f, *c-jun*; lane g, *p53*; lane h, Fas. Far left, 100-bp DNA ladder. The lower part of the figure shows the densitometric scan of the Polaroid negative of the gel.

no bone marrow expression of the TNF- $\alpha$  gene was the one who was receiving no treatment, and that all the other three patients with low expression of TNF- $\alpha$  were in the low-dose prednisone group.



**Fig. 3.** Gene expression pattern of a representative normal subject. The upper part of the figure shows a Polaroid negative with the appearance of PCR products in 1% agarose gel containing ethidium bromide. Lane a, cyclophilin; lane b, *bcl-2*; lane c, *bax*; lane d, *c-myc*; lane e, *c-fos*; lane f, *c-jun*; lane g, *p53*; lane h, Fas. Far left, 100-bp DNA ladder. The lower part of the figure shows the densitometric scan of the Polaroid negative of the gel.

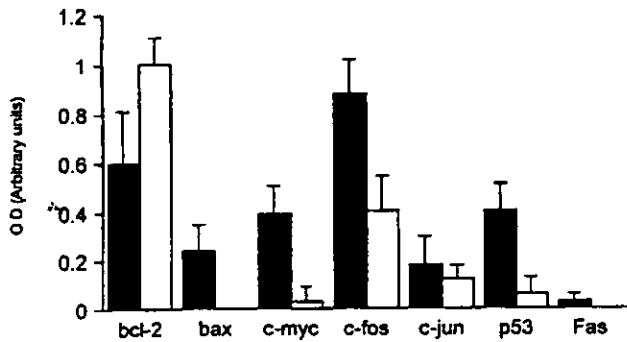


Fig. 4. Semiquantification of *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *p53* and *Fas* expression in bone marrow cells from SLE patients (white bars) and normal controls (black bars). Gene expression was semiquantified by PCR amplification of cDNA derived from mRNA. All values are quantified relative to the positive cyclophilin control included in each PCR determination. Bone marrow cells from eight SLE patients and eight normal subjects were analysed. Bars show mean values obtained from each group  $\pm$  standard error.

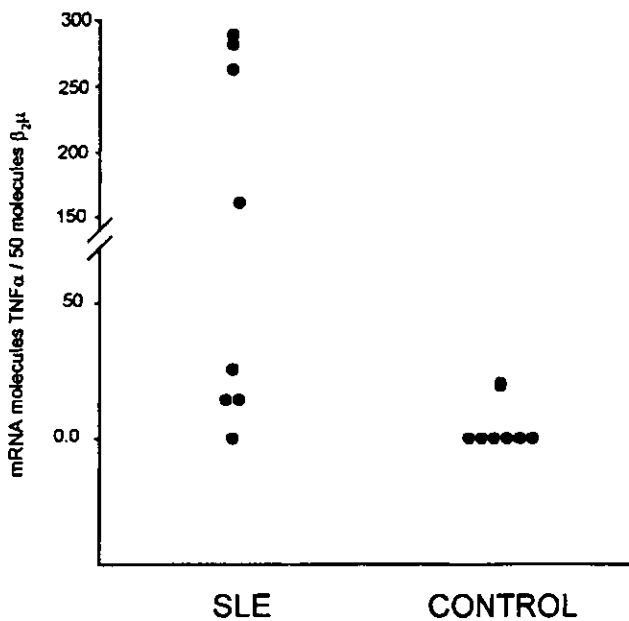


Fig. 5. Quantification of TNF- $\alpha$  in bone marrow cells from SLE patients and normal subjects. TNF- $\alpha$  mRNA is expressed as the number of mRNA molecules of TNF- $\alpha$  per 50 molecules of  $\beta$ -2 microglobulin. Individual values are shown.

## DISCUSSION

Microenvironmental events within the bone marrow might result in the expansion and migration of certain cells to the periphery, or in the apoptotic death of non-selected cells. Since several abnormalities have been described in the immune response of SLE patients, we decided to analyse those genes regulating growth and programmed cell death from cells that could originate such responses, i.e. bone marrow cells.

Bone marrow histological analysis ruled out cellular hypoplasia as a cause of haemocytopenia, thus indicating an autoimmune cause rather than an effect of immunosuppressive treatment. Bone marrow cells from SLE patients showed significant down-regulation of *c-myc*, *c-fos* and *p53*. Since *c-myc* and *c-fos* play key roles in proliferation, this down-regulation could decrease proliferation of bone marrow cells in SLE patients. In support of this hypothesis is the observation that *p53* transcription in bone marrow cells from SLE patients was down-regulated. As *p53* induces cell cycle arrest in the G1 phase, allowing DNA repair or induction of the cell death program [16], the low expression of *p53* in bone marrow cells from SLE patients suggests that these cells have left the cell cycle. The down-regulation of *p53* in haematopoietic cells from SLE patients may have another functional consequence: a decrease in the rate of spontaneous apoptosis. This seems to be the case since *bax* was down-regulated and *bcl-2* was up-regulated in bone marrow cells from SLE patients. Considering that the ratio of *bcl-2* to *bax* determines whether a cell receiving a death signal accepts it or ignores it, haematopoietic cells from SLE patients may present a defective death signal promoted by *bax*. Indeed, an increased expression of *bcl-2* has been described in SLE [9, 17]. Regarding the expression of *bcl-2*, *c-myc*, *c-fos* and *p53*, similar results have been obtained in peripheral blood mononuclear cells from SLE patients [18].

Controversial results have been reported concerning the role of *Fas* in haematopoietic interactions. Nagafugi *et al.* proposed that the suppression of haematopoiesis by negative haematopoietic regulators may be mediated in part by *Fas* [19], while Onel *et al.* concluded that the *Fas* pathway is not involved in the elimination of B cell progenitors within the bone marrow [20]. When *FasL* binds to *Fas*, the target cell undergoes apoptosis. The *Fas*-*FasL* system is involved in CTL-mediated cytotoxicity and in the down-regulation of several immune responses, thus, *Fas* may be involved in haematopoietic as well as lymphoid cell development.

Our results are in agreement with the findings of Onel *et al.*, suggesting that *Fas* does not promote apoptotic cell death during haematopoiesis.

An abnormal expression of TNF- $\alpha$  has been described in peripheral blood mononuclear cells from SLE patients [21, 22]. A promoter polymorphism of TNF- $\alpha$  has been associated with increased expression of this gene in SLE patients [23]. However, to the best of our knowledge, this is the first description of an elevated transcription of TNF- $\alpha$  in bone marrow cells from patients with this disease. This abnormality does not seem to be a consequence of treatment, since chloroquine and glucocorticoids down-regulate TNF- $\alpha$  expression in peripheral blood mononuclear cells [24, 25]. Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes to which hydroxychloroquine was added *in vitro* has been reported [26], and also apoptosis of lymphocytes induced by glucocorticoids [27].

In summary, we found abnormal expression of several genes regulating cell growth and apoptosis in bone marrow cells from SLE patients. These abnormalities may contribute to the generation of the autoreactive cells that are found in secondary lymphoid organs and peripheral blood of patients with SLE.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by a research grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; 0764 PM), Mexico. Dr Luis Llorente is the recipient of the Beatriz Vázquez Sámano Investigator Career Memorial Award. We are grateful to Alberto Palacios-Boix for critical review of the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445–8.
- 2 Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773–8.
- 3 Núñez GL, London D, Hockenberry M, Alexander JP, Mc Kearn Korshmeier SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990;144:3602–10.
- 4 Amati B, Land H. Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell-cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:102–8.
- 5 Colotta F, Polentarutti N, Mantovani A. Expression and involvement of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in a lymphoid cell line. *J Biol Chem* 1992;267:18278–83.
- 6 Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* 1993;7:855–65.
- 7 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449–55.
- 8 Oltvatti Z, Milliman C, Korshmeier S. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609–19.
- 9 Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW *et al.* High levels of Bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism* 1994;37:1423–30.
- 10 Tan EM, Cohen AS, Fries JF *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism* 1982;25:1271–7.
- 11 Guzmán J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992;119:1551–8.
- 12 Chomczynsky P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–60.
- 13 Bouaboula M, Legoux P, Pességué B *et al.* Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with multispecific internal control. *J Biol Chem* 1992;267:21830–6.
- 14 Legoux P, Minty C, Delpech B, Minty AJ, Shire D. Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin- $\beta$  stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerisation chain reaction method involving co-amplification with an internal multispecific control. *Eur Cytokine Network* 1992;3:553–63.
- 15 Llorente L, Richaud-Patin Y, Alcocer Castillejos N *et al.* Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. *J Hepatol* 1996;24:555–63.
- 16 Yonish-Rouach ED, Resnitzky J, Lotem L, Sachs A, Kimchi A, Oren M. Wild type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991;352:345–7.
- 17 Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA *et al.* Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 1993;72:325–30.
- 18 Lorenz HM, Grünke M, Hieronymus T, Herrman M, Künkel A, Manger B, Kalden J. *In vitro* apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheumatism* 1997;40:306–17.
- 19 Nagafuji K, Shibuya T, Harada M *et al.* Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 86:883–9.
- 20 Onel KB, Tuzek-Szabo C, Ashany D *et al.* Expression and function of the murine CD95/FasR/APO-1 receptor in relation to B cell ontogeny. *Eur J Immunol* 1995;25:2940–7.
- 21 Jacob CO, Mc Devitt HO. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in murine autoimmune lupus nephritis. *Nature* 1988;331:356–8.
- 22 Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA. Heritable major histocompatibility complex class II associated differences in production of tumor necrosis factor- $\alpha$ : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 1233–7.
- 23 Sullivan KE, Wooten C, Schmeckpeper BJ, Goldman D, Petri MA. Promoter polymorphism of tumor necrosis factor  $\alpha$  associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans. *Arthritis Rheumatism* 1997;40:2207–11.
- 24 Van den Borne B, Dijkmans B, de Rooij H, le Cessie S, Verweij C. Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-6 and interferon- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol* 1997;24:55–60.
- 25 Buttgerit F, Brink I, Thiele B, Hiepe F, Burmester GR, Hall E. Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen induced IL-6 and TNF- $\alpha$  production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:850–3.
- 26 Meng XW, Feller JM, Ziegler JB, Pittman SM, Ireland CM. Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes following treatment *in vitro* with hydroxychloroquine. *Arthritis Rheumatism* 1997;40:927–35.
- 27 Seki M, Ushiyama C, Seta N, Abe K, Fukazawa T, Asakawa J, Takasaki Y, Hashimoto H. Apoptosis of lymphocytes induced by glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism* 1998;41: 823–30.

## Conclusiones Parte I

En la primera parte de esta tesis, se estudió la participación de Fas y Bcl-2 en la apoptosis de linfocitos B de ratones. Los resultados encontrados indican que la función deficiente de Fas y la expresión elevada de Bcl-2, interfieren *in vitro* con la apoptosis inducida mediante radiación, choque térmico y dexametasona. Estos hallazgos sugieren que las células B que expresan la mutación *lpr* y/o el transgene *bcl-2*, podrían presentar deficiencias en la apoptosis inducida por estímulos fisiológicos. Las implicaciones de estos resultados *in vivo* se desconocen, pero los trastornos en la apoptosis de linfocitos B, podrían contribuir a la sobrevivencia de células autorreactivas y a su consecuente expansión clonal.

Un gran número de trabajos coinciden en afirmar que la apoptosis de linfocitos de ratones con la mutación *lpr* está disminuída *in vivo*, aunque existe controversia sobre el índice de apoptosis de éstas células *in vitro*. Pocos meses antes de la publicación del trabajo que constituye la Parte I de esta tesis, se publicó un artículo en el que se encontraron resultados semejantes (89). En suma, se encontró que la apoptosis de linfocitos B provenientes de bazo de ratones *lpr*, presentan un índice de apoptosis disminuído. Las condiciones experimentales y los hallazgos fueron semejantes a los nuestros. Los autores fueron más lejos en la caracterización de las células resistentes a la apoptosis, pues las definieron como linfocitos B, provenientes de ratones *lpr* o *gld*, que expresan CD23 en baja densidad. Nuestros hallazgos, al igual que los del trabajo antes mencionado, contrastan con los de otros grupos, que encuentran incrementada la apoptosis de estas células *in vitro* (90). Es probable que ciertas diferencias en las condiciones experimentales (tiempos de cultivo, métodos de separación de las células, subpoblaciones estudiadas, fondo genético de los ratones, etc), sean la causa de estas discrepancias.

Los modelos de enfermedad autoinmune en ratón son de gran utilidad puesto que en ellos es posible hacer manipulaciones genéticas. De este modo, es posible estudiar la función de un gene casi de manera individual si se controla adecuadamente el fondo genético. Un ejemplo de lo anterior son los ratones transgénicos, en los que se amplifica o se anula la expresión del gen en estudio. Además los ratones viven por periodos de vida relativamente cortos, lo cual permite el análisis de la evolución del padecimiento que manifiestan. Pero la extrapolación de los estudios en modelos animales al conocimiento de las enfermedades en humanos debe hacerse con cautela. Los trastornos que presentan los modelos animales, sólo se asemejan a las manifestaciones clínicas de los pacientes con LEG, pero desde diversos aspectos hay diferencias. Un ejemplo de lo anterior es el fondo genético, que si bien en humanos es complejo, en los ratones transgénicos representa una variable que se puede controlar durante las generaciones. Otra diferencia sustancial entre los pacientes con LEG y el modelo en ratones es el grado en el que se puede llegar a incrementar la expresión de un gene. Tal es el caso de *bcl-2*, que si bien es indiscutible que en ratones transgénicos ocasiona un síndrome autoinmune, en los pacientes no hay bases para afirmar lo anterior, en parte porque la expresión de *bcl-2* no está tan incrementada. La función de un transgene en principio difiere del comportamiento normal de los genes, puesto que amplifica de sobremanera la expresión de la molécula en estudio. Así pues, es importante diferenciar los efectos del gene per se, de los artefactos debidos al incremento en su expresión. Además la localización de la expresión de un transgene puede controlarse, limitándose así a una determinada subpoblación celular o tejido. Un ejemplo de lo anterior es la expresión del transgene que codifica para Bcl-2, exclusivamente en linfocitos B, en la cepa de ratones C57BL/6-E  $\mu$ -*bcl-2*-22. En esta cepa, la expresión de Bcl-2 en linfocitos B promueve la longevidad de éstas células, lo cual conduce a la manifestación de enfermedad autoinmune con títulos altos de autoanticuerpos. La manera más simple de explicar la elevada producción

de autoanticuerpos en estos ratones es mediante el hecho de que los linfocitos autorreactivos no se eliminan adecuadamente, y además al diferenciarse a células plasmáticas viven por períodos más prolongados. En cambio, la expresión de este transgene exclusivamente en linfocitos T (en la cepa C57BL/6-E  $\mu$ -*bcl-2-36*), induce la manifestación de enfermedad autoinmune de manera tardía y notablemente menos severa.

Con la finalidad de comprender el significado de la muerte celular fisiológica, se acuñó el término "apoptosis", que comprende una serie de eventos. Debido a que este proceso de muerte puede variar en el orden y la característica de los eventos, no existe un método universal para la detección de la apoptosis. Un ejemplo de lo anterior es la síntesis de proteínas, que no necesariamente ocurre en todos los procesos de apoptosis. En el presente trabajo se empleó el método de TUNEL para la detección de apoptosis. Este método detecta la fragmentación del DNA, puesto que se basa en la unión específica de nucleótidos marcados a los extremos 3' -OH del DNA. Se eligió el método de TUNEL debido a que presenta varias ventajas. La primera es que permite la detección de la apoptosis en células a nivel individual, puesto que se preserva la arquitectura tisular. Esto es de gran importancia cuando se estudian poblaciones celulares heterogéneas, en las que la apoptosis no ocurre de manera sincronizada (como sucede en las líneas celulares). Con el método de TUNEL se pueden observar además cambios morfológicos, tales como la reducción en el volumen celular. También es posible visualizar la compactación de la cromatina puesto que se observa un patrón de tinción nuclear particular en las células en apoptosis.

## Conclusiones Parte II

Se han descrito diversas anomalías en la respuesta inmune en LEG. Con la finalidad de definir si estos trastornos se generan desde la médula ósea o en la periferia, en la segunda parte de este trabajo se cuantificaron los transcritos de algunos genes involucrados en el crecimiento y muerte celular fisiológica en médula ósea de pacientes con LEG. En numerosos trabajos se ha estudiado la expresión de genes reguladores de proliferación y de apoptosis en células de sangre periférica de pacientes con dicho padecimiento. La particularidad del presente trabajo radica en que es el primer estudio sobre los genes antes mencionados, en médula ósea de pacientes con LEG. El haber detectado en menor proporción el RNAm para c-Myc y c-Fos en médula ósea de los pacientes, sugiere una menor actividad mitogénica en la médula ósea, pues ambos genes tienen un papel importante en el crecimiento celular. Esta noción coincide con el hecho de que los transcritos de p53 también se detectaron en menor proporción en la médula ósea de los pacientes. Cuando se generan mutaciones durante la replicación del DNA, la función de p53 es mantener a las células en la fase G1. De ser posible, las células reparan las mutaciones, pero de no ser así, programan su muerte celular. Por tanto, la proporción disminuida de RNAm para p53 sugiere un menor índice de proliferación en la médula ósea de los pacientes. Otra consecuencia funcional de este hecho podría ser la disminución en el índice de apoptosis mediado por p53 en células hemopoéticas de los pacientes. Adicionalmente, los transcritos de Bax se encontraron disminuidos y los de Bcl-2 elevados en la médula ósea de los pacientes. En conjunto, la disminución en la expresión de p53 y Bax, aunada a la elevada expresión de Bcl-2, sugiere un menor índice de apoptosis en médula ósea de los pacientes. Desafortunadamente, no fue posible evaluar cualitativa y cuantitativamente el índice de apoptosis, pues las muestras fueron insuficientes. Idealmente, hubiera sido útil demostrar la correlación entre el índice de apoptosis espontánea con los niveles de transcritos de los genes promotores de



apoptosis. La expresión anormal de ciertos genes en médula ósea de los pacientes, sugiere que algunas de las anomalías fenotípicas en LEG se generan en células de línea germinal. Es importante considerar que estos resultados en conjunto, concuerdan con los hallazgos previamente reportados en sangre periférica de pacientes con LEG (91).

En diversos estudios se ha demostrado que la expresión de Bcl-2 es elevada en linfocitos de pacientes con LEG. Actualmente no se sabe si la expresión de Bcl-2 en LEG está afectada intrínsecamente debido a alguna predisposición genética, o bien, si ésta se eleva por la continua activación celular. Las consecuencias de la expresión elevada de Bcl-2 en linfocitos de pacientes con LEG se desconocen, pero podría especularse que son diversas. Dado que la expresión de Bcl-2 es elevada en linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (49), sería lógico esperar que estos linfocitos presentaran cierta resistencia a la muerte celular fisiológica, y por tanto, fuesen autorreactivos. En caso de que estas células autorreactivas fuesen más longevas (puesto que Bcl-2 retarda la apoptosis, pero no induce inmortalidad), podrían cooperar con los linfocitos B durante periodos anormalmente prolongados. De ser así, podrían inducir la activación policlonal de linfocitos B y por consecuencia, la producción elevada de autoanticuerpos.

Cabe mencionar que en el estudio de la patogenia de enfermedades autoinmunes, es importante integrar la información sobre citocinas con la información sobre genes reguladores de apoptosis. En este caso, es importante recordar que la IL-10 induce la expresión de Bcl-2 en linfocitos de centros germinales (32). Por lo anterior, la elevada expresión de Bcl-2 y la relativa resistencia a la apoptosis no deberían interpretarse solamente como un defecto en la maquinaria de muerte celular, sino también como un defecto de

inmunorregulación. Recientemente se caracterizaron los microsatélites presentes en *bcl-2* e *IL-10*, con lo cual se determinó el grado de polimorfismo de estos genes tanto en los pacientes como en la población normal. Así se identificaron secuencias intragénicas en ambos genes, que en combinación, confieren un riesgo 40 veces mayor a desarrollar LEG. Estos hallazgos sugieren que en ciertas circunstancias la cooperación de Bcl-2 e IL-10, permite la sobrevivencia de linfocitos autorreactivos (92).

En la introducción se mencionó la controversia entre los diferentes hallazgos sobre el papel del sistema Fas-Gld en la eliminación de células hematopoyéticas. En este trabajo los transcritos de Fas detectados en células de médula ósea de pacientes y de controles sanos, sólo se detectaron en mínima proporción en dos muestras. Lo anterior apoya la hipótesis de que Fas no participa en los eventos de apoptosis que ocurren en médula ósea. En cambio, su papel en la eliminación de células activadas en centros germinales es crucial en la regulación de la respuesta inmune.

La expresión de TNF-alfa en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LEG es anormal (93). La expresión elevada de esta citocina en ciertos casos se ha asociado con polimorfismos en el promotor (94). En este trabajo, se encontró un incremento significativo en los transcritos de TNF-alfa en médula ósea de los pacientes con LEG. Esta anomalía no parece ser consecuencia del tratamiento, pues tanto la cloroquina como los esteroides disminuyen la expresión del TNF-alfa por células mononucleares de sangre periférica ( 95, 96, 97).

La estimación objetiva de la apoptosis en la médula ósea no se llevó a cabo, pero por las razones antes mencionadas, es válido suponer que está disminuída en las células de los pacientes. De ser este el caso,

sería un fenómeno inherente al LEG, no al tratamiento. Esa noción se basa en el hecho de que tanto la cloroquina como los esteroides inducen apoptosis en células mononucleares de sangre periférica, es decir, tienen el efecto opuesto al que se observó (98, 99).

El papel del TNF-alfa en la hematopoyesis es complejo, pues su efecto como regulador positivo o negativo, depende en gran medida de la presencia de otras citocinas con las que ha de cooperar. En presencia de IL-6 ó de IL-9 funciona como regulador negativo de la hematopoyesis, pero en presencia de GM-CSF o de IL-3 funciona como regulador positivo (100). Por tanto, para una mejor interpretación del papel del TNF-alfa en la médula ósea de los pacientes, es necesario cuantificar también los transcritos de las citocinas con las que interactúa. En la introducción se mencionó que la producción de IL-6 es elevada en células de sangre periférica de pacientes con LEG. Si esta anomalía ocurriera también en la médula ósea, podría especularse que en presencia de IL-6, el TNF-alfa podría estar actuando como un regulador negativo de la hematopoyesis. Este parece ser el caso pues todos los pacientes estudiados presentaron hemocitopenia. La noción de que la IL-6 podría estar elevada en la médula ósea de los pacientes concuerda con el hecho de que el TNF-alfa induce la producción de ésta en macrófagos (19). La aparente disminución en el índice de apoptosis en la médula osea de los pacientes, también podría explicarse mediante la producción elevada de IL-6, puesto que esta interleucina inhibe la apoptosis durante la hematopoyesis (101).

La cuantificación de transcritos del TNF-alfa se efectuó mediante el método de PCR cuantitativa. Se empleó la técnica descrita por Shire (102) para la cuantificación de RNAm de diversos genes mediante la retrotranscripción seguida de la reacción de PCR (RT-PCR). Este método involucra el uso de un RNA

estándar multi-específico proveniente del vector pQA-1, de cantidad conocida, que se retrotranscribe simultáneamente con el RNAm proveniente de una muestra cuyo número de moléculas se desea determinar. Dado que la retrotranscripción del RNA de la muestra y del estándar es simultánea, la reacción es competitiva. El producto de la reacción de PCR proveniente del RNA estándar es de diferente longitud que el producto proveniente del RNA de la muestra. Esto es con la intención de que ambos productos puedan ser separados mediante electroforesis.

Durante la estandarización del método se llevaron a cabo las siguientes consideraciones: 1) Se efectuaron curvas de cinética en las que la amplificación se llevó a cabo variando el número de ciclos y manteniendo constante la cantidad del cDNA proveniente del estándar (st-cDNA) y de la muestra (m-cDNA). De este modo, se obtuvo una curva al graficar el número de ciclos contra el producto amplificado a partir del st-cDNA, y otra al graficar el número de ciclos contra el producto amplificado a partir del m-cDNA. El número de ciclos que se eligió para las amplificaciones se encontró en una zona donde las curvas fueron paralelas y su pendiente fue positiva, antes de llegar al *plateau* o meseta. 2) Se efectuaron curvas de titulación, en las que se mantuvo constante el número de ciclos y la cantidad de st-cDNA. La variable en este caso fue la cantidad de m-cDNA. De esta manera fue posible tener una idea aproximada de la cantidad de cDNA contenida en las muestras. Así, se determinó la cantidad óptima de RNAm que debía utilizarse (1  $\mu$ g) para que el producto amplificado fuese detectable. 3) En todos los casos se empleó 1  $\mu$ g de RNAm proveniente de las muestras. Para corregir las posibles variaciones en el contenido de RNAm inicial, cada muestra fue normalizada con base a su contenido de beta-2 microglobulina. Los resultados se expresaron como el número de moléculas de RNAm de TNF-alfa, por cada 50 moléculas de beta-2 microglobulina. 4) Los iniciadores sentido y antisentido contenidos en el st-cDNA constan de 20 nucleótidos y una proporción

de dC/dG del 50 %, por lo que tienen valores de  $T_m$  semejantes. Además, dado que cada par de iniciadores guarda la misma distancia entre sí dentro del vector, la eficiencia en la amplificación es similar en todos los genes.

Con excepción de los transcritos de TNF-alfa y beta-2 microglobulina, el análisis de los demás genes fue semi-cuantitativo. Mediante este método no es posible conocer el número de moléculas de RNAm del gen estudiado. El método semicuantitativo proporciona la relación de transcritos de un gen constitutivo con la del gen estudiado, asumiendo que la expresión del primero no varía con el tratamiento ni con el estado patológico. A pesar de que es un método aproximado de análisis de transcritos, en este trabajo fue posible detectar diferencias significativas entre las células de los pacientes y las de los individuos normales. En este caso sólo fue posible hacer curvas de titulación y de cinética con el m-cDNA pero no con el st-cDNA. En todos los casos se partió de 1  $\mu$ g de RNAm proveniente de las muestras.

La finalidad de las consideraciones antes mencionadas fue la de cuantificar de la manera más precisa el número de transcritos de cada gen en cada una de las muestras. Pero es importante considerar que el número de transcritos no proporciona la información completa sobre lo que ocurrirá con una proteína. En otras palabras, el cuadro completo debería incluir información sobre los mecanismos post-traduccionales, expresión y función de la proteína.

Uno de los objetivos de este trabajo fue el de correlacionar la actividad de la enfermedad con los niveles de RNAm detectados en médula ósea de los pacientes. En ninguno de los genes estudiados en el grupo de pacientes, se encontró correlación entre la cantidad de transcritos y la actividad de la enfermedad. De

lo anterior se puede concluir que las anomalías antes mencionadas son inherentes al LEG, pero no tienen relación con los períodos de remisión o actividad de la enfermedad.

En la introducción se mencionó la importancia de los factores ambientales, genéticos y hormonales en la manifestación de las enfermedades autoinmunes. Por tanto, el estudio de genes reguladores de la muerte fisiológica y de la proliferación celular es sólo una forma de aproximación al estudio de estos padecimientos. La intención de esta tesis no es simplificar la etiología de las enfermedades autoinmunes a las deficiencias en los mecanismos de apoptosis. Sin embargo, es importante documentar la relevancia de la muerte celular en los padecimientos autoinmunes.

### **Perspectivas terapéuticas**

Existen más de 40 padecimientos de origen autoinmune (103). Un número significativo de estas patologías alcanza tal grado de gravedad, que sólo pueden ser tratadas parcialmente. En estos casos, la terapia actual consta de inmunosupresores a largo plazo, lo cual suele acompañarse de múltiples efectos adversos para el organismo. Se ha llegado a plantear la necesidad de evaluar la validez de las terapias que mejoran la calidad de vida de momento, pero generan una infinidad de secuelas a largo plazo. El tratamiento de las enfermedades autoinmunes requiere de terapias más eficientes y específicas. En este sentido, es indispensable definir con precisión cuáles son los agentes causales de estas patologías y cómo interactúan entre ellos.

Existen diferentes líneas de investigación dirigidas hacia la búsqueda de terapias menos tóxicas. Tal es el caso de la inmunointervención con inhibidores específicos de la producción de citocinas, o anticuerpos

lo anterior se puede concluir que las anomalías antes mencionadas son inherentes al LEG, pero no tienen relación con los períodos de remisión o actividad de la enfermedad.

En la introducción se mencionó la importancia de los factores ambientales, genéticos y hormonales en la manifestación de las enfermedades autoinmunes. Por tanto, el estudio de genes reguladores de la muerte fisiológica y de la proliferación celular es sólo una forma de aproximación al estudio de estos padecimientos. La intención de esta tesis no es simplificar la etiología de las enfermedades autoinmunes a las deficiencias en los mecanismos de apoptosis. Sin embargo, es importante documentar la relevancia de la muerte celular en los padecimientos autoinmunes.

### **Perspectivas terapéuticas**

Existen más de 40 padecimientos de origen autoinmune (103). Un número significativo de estas patologías alcanza tal grado de gravedad, que sólo pueden ser tratadas parcialmente. En estos casos, la terapia actual consta de inmunosupresores a largo plazo, lo cual suele acompañarse de múltiples efectos adversos para el organismo. Se ha llegado a plantear la necesidad de evaluar la validez de las terapias que mejoran la calidad de vida de momento, pero generan una infinidad de secuelas a largo plazo. El tratamiento de las enfermedades autoinmunes requiere de terapias más eficientes y específicas. En este sentido, es indispensable definir con precisión cuáles son los agentes causales de estas patologías y cómo interactúan entre ellos.

Existen diferentes líneas de investigación dirigidas hacia la búsqueda de terapias menos tóxicas. Tal es el caso de la inmunointervención con inhibidores específicos de la producción de citocinas, o anticuerpos

monoclonales dirigidos contra éstas. La mayoría de los estudios apenas se están efectuando en ratones, pero ya existen algunos resultados preliminares en humanos. Recientemente se evaluó la eficacia de un anticuerpo monoclonal anti-TNF-alfa en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide. Los resultados fueron positivos, pues el tratamiento no resultó ser tóxico y condujo a la mejoría clínica temporal de los pacientes. Aún no se sabe si este tratamiento conduce a períodos más largos de remisión de la enfermedad (104).

Otra línea de investigación dirigida hacia la terapéutica de padecimientos autoinmunes, es la relacionada con los mediadores de apoptosis. Este campo es relativamente nuevo, por lo que aún falta definir hasta qué punto las anormalidades en el proceso de apoptosis son la causa de estas enfermedades. Algunos trabajos demuestran que las moléculas reguladoras de apoptosis tienen un papel relevante en la patogénesis de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, en los ratones diabéticos NOD, la expresión de Fas en las células beta de los islotes de Langerhans, las hace vulnerables a la apoptosis inducida por los linfocitos T autorreactivos. La apoptosis masiva mediada por Fas en las células beta representa el principal mecanismo de destrucción tisular en el páncreas de ratones que desarrollan diabetes autoinmune (105). El fin último de los estudios acerca de las moléculas involucradas en el proceso de apoptosis, es el de incidir en la regulación de tales eventos. En el caso de la diabetes en ratones NOD, sería ideal inhibir selectivamente la vía de apoptosis mediada por Fas en las células beta. En cambio, podría pensarse en casos hipotéticos en los que resultaría benéfico inducir selectivamente la apoptosis de linfocitos autorreactivos.



El trasplante de médula ósea es otro campo de investigación en la terapia de padecimientos autoinmunes. Esta terapia se basa en la lógica de que, al menos en modelos animales de LEG, la enfermedad autoinmune es causada por anomalías genéticas en las células progenitoras. Existe una gran controversia sobre la evolución que habrían de tener los pacientes en caso de ser transplantados. En apoyo a esta terapia está la idea de que automáticamente disminuirían los niveles de autoanticuerpos circulantes y complejos inmunes. Además se esperaría la reducción del daño tisular y autoantígenos circulantes. En teoría desaparecería el requerimiento de inmunosupresores y su toxicidad a largo plazo sería eliminada. Finalmente, la restauración de los circuitos de inmunorregulación normalizaría la inmunidad celular y humoral. Por otra parte, los trasplantes que se han realizado en modelos animales han resultado prometedores. En ratas con artritis inducida por adyuvante, fue posible revertir la enfermedad; en ratones con nefritis autoinmune, diabetes o LEG, también fue posible prevenir la enfermedad (106). Cabe mencionar que existen varios argumentos en contra del trasplante alogénico de médula ósea. Probablemente el más fuerte es que las células transplantadas eventualmente serían reemplazadas por células del mismo fenotipo que originó el padecimiento. Las células transplantadas podrían morir debido a la posibilidad de rechazo al trasplante.

Alternativamente se ha planteado el trasplante autólogo de médula ósea. En teoría, las células por transplantar se obtendrían durante los periodos de remisión de la enfermedad. Estas células se almacenarían y sólo en caso de activación de la enfermedad, serían transplantadas al mismo individuo del que se obtuvieron. De este modo, podría evitarse el rechazo al trasplante y la administración de fármacos inmunosupresores que suele acompañar al trasplante alogénico (107).

La etiología de las enfermedades autoinmunes es multifactorial. Dado que son padecimientos complejos en cuanto a sus manifestaciones inmunológicas y clínicas, su estudio se encuentra aún en un nivel descriptivo. El estudio sobre la terapéutica está avanzando en diferentes direcciones, pero aún no existe la cura de estas patologías.

## Bibliografía

- 1) Behar SM, Porcelli SA. Mechanisms of autoimmune disease induction. *Arthritis Rheum* 1995. (38):458-76.
- 2) Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol Today* 1995. (16):90-8.
- 3) Georgopoulos C, Mc Farland H. Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Immunol Today* 1993. (14): 373-5.
- 4) Kotb M. Infection and autoimmunity. A story of the host, the pathogen and the copathogen. *Clin Immunol Immunopathol* 1995. (74): 10-22.
- 5) Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today* 1995. (16):150-8.
- 6) Klein J. *Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Great Britain, 1991.
- 7) Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Ballow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: Basic and clinical correlates. *Ann Int Med* 1993. (119):1198-1208.
- 8) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 1982. (25):1271-77.
- 9) Guzmán J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sánchez-Guerrero J and Alarcón-Segovia D. Measurement of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheum* 1992. (19):1551-8.
- 10) Ferrel PB. Systemic lupus erythematosus. *The Autoimmune diseases*. Academic Press, 1986.
- 11) Wilder RL. Neuroendocrine-Immune interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 1995. (13):307-38.
- 12) Berczi I, Baragar FD, Chalmers IM, Keystone EC, Nagy E, Warrington RJ. Hormones in self tolerance and autoimmunity: a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 1993. (16):45-56.
- 13) Jara LJ, Gómez-Sánchez C, Silveira LH, Martínez-Osuna P, Vasey FB, Espinoza LR. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992. (303):222-6.
- 14) Petri M. Systemic lupus erythematosus and pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am*.1994. (20):87-118.

- 15) Jara-Quezada L, Graef A, Lavalle C. Prolactin and gonadal hormones during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1991. (18):349-53.
- 16) Deapen D, Escalante A, Weinrib L, et al. Revised estimate of twin concordance in SLE. *Arthritis Rheum* 1992. (35):311-8.
- 17) Llorente L, Richaud-Patin Y, Couderc J, et al. Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arth & Rheum* 1997. (49):1429-35.
- 18) Granados-Arriola J, Yamamotoo-Furusho JK. Las bases genéticas de las enfermedades autoinmunes. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 1996. (4):6-14.
- 19) Galanaud P, Emilie D. *Cytokines et Médecine Interne*. Masson Eds. Paris, 1997.
- 20) Naprasek Y. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 1993. (11): 79-104.
- 21) Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia, D. Decreased production of and response to IL-2 by cultures lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1982. (69):1388-92 .
- 22) Crispin JC, Alcocer-Varela J. Interleukin-2 and systemic lupus erythematosus: Fifteen years latter. *Lupus* 1998. (7):214-22.
- 23) Rosen FS, Steiner LA, Unanue ER. *Immunology*. Elsevier Science Publishing Science Co; Inc. The Macmillan Press Ltd, 1989.
- 24) Alcocer-Varela J, Laffón A, Alarcón-Segovia D. Defective monocyte production of, and T lymphocyte response to, interleukin-1 in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1984. (55):125-32.
- 25) Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J, Llorente L. High levels of TH2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. *Rev Invest Clin* 1995. (47): 267-72.
- 26) Nagafuchi H, Susuki N, Sakane T. Constitutive expression of IL-6 receptors and their role in excessive B cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1993. (151): 6525-34.
- 27) Bendtzen K, Morling N, Formsgard A, et al. Association between HLA-DR2 and production of TNF-alfa and IL-1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 1988. (28): 599-676.
- 28) Wilson AG, Duff GW, Genetics of TNF-alfa. *Lupus* 1996. (5): 87-88.

- 29) Llorente L, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, Maillot MC, Durand-Gasselín I, Morel-Fourier B, Galanaud P, Emilie D. Spontaneous production of IL-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 1993. (4): 421-30.
- 30) Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, et al. In vivo production of IL-10 by non T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Arth & Rheum* 1994. (37): 1647-55.
- 31) Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, Morel-Fourier B, Brouet JC, Alarcón-Segovia D, Galanaud P, Emilie D. Role of interleukin-10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1995. (181): 839-44
- 32) Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the Bcl-2 protein. *J Clin Invest* 1994. (93): 424-8.
- 33) Emilie D, Llorente L, Galanaud P. Cytokines et Lupus. *Ann Med Interne* 1996. (147): 480-84.
- 34) Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles SR, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival. *Phil Trans R Soc Lond B.* 1994. (345): 265-8.
- 35) Winoto A. Cell death in the regulation of immune responses *Curr Op Immunol* 1997. (9): 365-70.
- 36) Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, Van Kaer L, Pircher HP, Zinkernagel RM, Tonegawa S. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 1994. (76): 651-63.
- 37) Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994. (152): 3685-92.
- 38) Herrmann MH, Voll RV, Zoller OM, Hagenhoffer M, et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 1998. (41): 1241-50.
- 39) Tax WJ, Kramers C, van Bruggen MC, Berden HM. Apoptosis, nucleosomes and nephritis in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 1995. (48): 666-73.
- 40) Krontrís T. *Oncogenes*. *New Eng J Med* 1995. (333):303-6.
- 41) Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Bcl-2 expression is unaltered in unfractionated peripheral blood mononuclear cells in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *British J Rheum* 1995. (34): 316-320.
- 42) Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, et al. High levels of Bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes of patients with systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994. (37): 1423-30.

- 43) Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus. *British J Rheumatol* 1997. (36): 158-63.
- 44) Matuzaki Y, Nakayama K, Tomita N, Isoda M, Loh DY, Nakauchi H. Role of Bcl-2 in the development of lymphoid cells from the hematopoietic stem cell. *Blood* 1997. (89): 853-62.
- 45) Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997. (19): 773-5.
- 46) Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997. (18): 44-51.
- 47) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997. (275): 1132-6.
- 48) Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A, Goodnow CC. Elimination of self reactive B lymphocytes proceeds in two stages: Arrested development and cell death. *Cell* 1993. (72): 325.
- 49) Maraskovsky E, O'Reilly LA, Teepe M, Corcoran LM, Peschon JJ, Strasser A. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor deficient mice but not in mutant rag-1<sup>-/-</sup> mice. *Cell* 1997. (89): 1011-19.
- 50) Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993. (74): 609-19.
- 51) Fisher F, Jayaraman PS, Golding C. c-myc and the yeast transcription factor PHO4 share a common CACGTG-binding motif. *Oncogene* 1991. (6):1009-1104.
- 52) Amati B, Land H. Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell-cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 1994. (4): 102-8.
- 53) Perkins AS, Stern DF. *Molecular Biology of Cancer: Oncogenes. Cancer: Principles and practice of oncology.* 5th Ed. Vincent De Vita. Raven Publishers, Philadelphia, 1977. p 79-102.
- 54) Bissonette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green, D. Apoptotic cell death induced by c-Myc is inhibited by Bcl-2. *Nature* 1992. (359): 552-554.
- 55) Sonenshein GE. Down modulation of c-Myc expression induces apoptosis of B lymphocyte models of tolerance via clonal deletion. *J Immunol* 1997. (158): 1994-7.
- 56) Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-Myc protein. *Cell* 1992. (69): 119-128.

- 57) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991. 49-52.
- 58) Berns, A. Is p53 the only real tumor suppressor gene? *Curr Biol* 1994. (4): 137-39.
- 59) Bennett M, Evan G, Schwartz S. Apoptosis of a rat smooth muscle is regulated by p53 dependent and independent pathways. *Circ Res* 1995. (77): 266-72.
- 60) Ashany D, Song X, Lacy E, Nicolic-Zugic J, Friedman SM. Th1 CD4+ lymphocytes delete activated macrophages through the Fas/Apo-1 antigen pathway. *PNAS* 1995. (92): 1125-29.
- 61) Cheng J, Zhou T, Liu C, Saphiro JP; et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994. (265): 1759-62.
- 62) Nozawa K, Kayagaki N, Tokano I, Yagita H, Okumura K, Hashimoto H. Soluble Fas (Apo-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997.
- 63) Le Deist F, Emilie JF, Rieux-Laucat F, Benkerrou M, Roberts I, Brousse N, Fischer A. Clinical, immunological and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* 1996. (348): 719-23.
- 64) Vaishnaw AK, McNally JD, Elkton KB. Apoptosis in the rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism* 1997.(40):1917-27.
- 65) Wu J, Wilson J, He J, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand-mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996. (98): 1107-13.
- 66) Suda T; Nagata S. Purification and characterization of the Fas ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994. (179): 873-79.
- 67) Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 1994. (6): 1567-74.
- 68) Onel KB, Tucer-Tzabo CL, Ashany D, Lacy E, Nicolic-Zugic JN, Elkton KB. Expression and function of the murine CD95/FasR/APO-1 receptor in relation to B cell ontogeny. *Eur J Immunol* 1995 (25): 2940-47.
- 69) Nagafuji K, Shibuya T, Harada M, Mizuno S, Takenaka K, Miyamoto T, Gondo Y. Functional Expression of Fas Antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995. (86): 883-89.
- 70) Current T, Vogt P. Dangerous liaisons: Fos, Jun, oncogenic transcription factors. In: *Transcriptional regulation*. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- 71) Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SB, Miao GG, et al. Continuous c-Fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 1993. (363): 166-69.

- 72) Dragunow M, Young D, Hughes P, Mac Gibbon G, Lawlor P, Shirimanne E, Beilhartz E, Gluckman P. Is jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischemic brain injury? *Brain Res Mol* 1993. (18): 347-52.
- 73) Colotta F, Polentarutti, Mantovani A. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J Biol Chem* 1992. (267): 18278-83.
- 74) Marti A, Jehn B, Costello E, Keon N, Ke G, Martin F, Jaggi R. Protein kinase-A and AP-1 (c-fos/jun-D) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* 1994. (9): 1213-23.
- 75) Philip Cohen. *Current Protocols in Immunology*, 1992. Murine models of immunodeficiency and autoimmune diseases. J Willey & Sons. Suppl (3): 12-20.
- 76) Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 1985. (37): 269-89.
- 77) Hicks JD, Burnet FM. Renal lesions in the "autoimmune" mouse strains NZB and (NZB x NZW)F1. *J Pathol Bact* 1966. (11): 443.
- 78) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992. (356): 314-17.
- 79) Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and Gld: Single gene models for systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991. (9): 243-69.
- 80) Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, et al. Spontaneous lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 1988. (148): 1198-1215.
- 81) Murphy ED, Roths JB. In "Genetic control of Autoimmune disease". Rose NR eds. Elsevier North Holland New York.
- 82) Okamoto M, Murakami M, Shimizu A, Ozaki S, Tsubata T, Kumagai S, Honjo T. A transgenic model of autoimmune hemolytic anemia. *J Exp Med* 1992. (175): 71-9.
- 83) Erikson J, Radic MZ, Camper SA, Hardy RR, Carmarck C, Weigert M. Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* 1991. (349):331-4.
- 84) Nemazee D, Burki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 1989. (337):562-6.



- 85) Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie TB, Smith-Gill SJ, Brink RA, Pritchard-Briscoe H, et al. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988. (334): 676-82.
- 86) Teh HS, Kishi H, Scott B, von Boehmer H. Deletion of autospecific T cells in T cell receptor (TCR) transgenic mice spares cells with normal TCR levels and low levels of CD8 molecules. *J Exp Med* 1989. (169): 795-806.
- 87) Boneville M, Ishida I, Itohara S, Verbeek S, Berns A, Kanagawa O, Haas W, Tonegawa S. Self tolerance to gamma-delta T cells by intrathymic inactivation. *Nature* 1990. (344): 163-5.
- 88) Strasser AS, Wittingham DL, Vaux ML, Bath JM, Adams, Cory S, et al. Enforced *bcl-2* expression in B lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991. (88): 861-5.
- 89) Reap EA, Leslie D, Abrahams M, et al. Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune *lpr* and *gld* mice. *J Immunol* 1995. (154): 936-43.
- 90) Van Houten N, Budd RC. Accelerated programmed cell death of MRL-*lpr/lpr* T lymphocytes. *J Immunol* 1992. (149): 2513.
- 91) Lorenz HM, Grünke M, Hieronymus T, et al. In vitro apoptosis and expression of apoptosis related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arth & Rheum* 1997; (40): 306-17.
- 92) Mehrian R, Quismorio FP, Strassman G, et al. Synergistic effect between *IL-10* and *bcl-2* genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum* 1998. (41): 596-602.
- 93) Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M and Hansen JA. Heritable major histocompatibility system complex class II associated differences in production of tumor necrosis- $\alpha$ : Relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci* 1990. (87): 1233-37.
- 94) Sullivan KE, Wooten C, Schmeckpeper BJ, Goldman D, Petri M.A. Promoter polymorphism of tumor necrosis factor  $\alpha$  associated with systemic lupus erythematosus in african-americans. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2207-11.
- 95) Van den Borne B, Dijkmans B, de Rooij H, le Cessie S, Verweij C: Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-6 and interferon- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol* 1997. (24): 55-60.
- 96) Buttgereit F, Brink I, Thiele B, Hiepe F, Burmester GR, Hall E. Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen induced IL-6 and TNF- $\alpha$  production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995. (275): 850-3.

- 97) Buttgerit F, Wehling M, Burmester GR. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions. *Arth Rheum* 1998. (41): 761-67.
- 98) Meng XW, Feller JM, Ziegler JB, Pittman SM, Ireland CM. Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes following treatment in vitro with hydroxychloroquine. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 927-35.
- 99) Seki M, Ushiyama C, Seta N, Abe K, Fukazawa T, Asakawa J, Takasaki Y, Hashimoto H. Apoptosis of lymphocytes induced by glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 823-30.
- 100) Jacobsen SE, Jacobsen FW, Fahlman C, Rusten LS. Polyfunctionality of hemopoietic regulators. *The metcalf forum. Stem Cells*. 1994;12 (suppl 1):111-28. Alpha Med Press.
- 101) Kawano MM, Mihara K, Huang N, Tsujimoto T, Kuramoto A. Differentiation of early plasma cells on bone marrow stromal cells requires interleukin-6 for escaping from apoptosis. *Blood* 1995. (85): 487-94.
- 102) Boulaboula M, Legoux P, Pességué B, Delpech B, Dumont X, Piechaczky M, Casellas P & Shire D. Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J Biol Chem* 1992. (267): 21830-8.
- 103) Marmont AM. Stem cell transplantation for severe autoimmune disorders, with special reference to rheumatic diseases. *J Rheum* 1997. (suppl 48)(24): 13-18.
- 104) Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to TNF- $\alpha$ . *Arthritis Rheum* 1993. (36): 1681-90.
- 105) Chervonsky AV, Wang Y, Wong SF, Visintin I, Flavell RA, et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997. (89): 17-24.
- 106) Brooks PM. Hematopoietic Stem cell transplantation for autoimmune diseases. *J Rheum* 1997. (suppl 48) 24: 19-22.
- 107) Hahn BV. The potential role of autologous stem cell transplantation in patients with SLE. *J Rheum* 1997. (suppl 48) 24: 89-93.