

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**APOPTOSIS, CD95/FAS/APO-1  
Y SU TRASCENDENCIA EN EL  
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO  
HUMANO Y MURINO**

**Paula Ramos Núñez**

**1995**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**APOPTOSIS, CD95/FAS/APO-1  
Y SU TRASCENDENCIA EN EL  
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO  
HUMANO Y MURINO**

Realizada por:

**Paula Ramos Núñez**

Director:

**Dr. Juan Angel Jover Jover**

Tutor:

**Ramón Patiño Barrios**

**1995**

President

Prof. A. Tomas de Guzman

Vice President

J. Lopez de Arana

Jose Antonio Arana

Manuel Lopez

Secretary

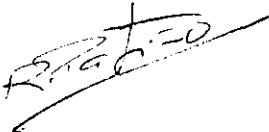
Secretary

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS


Como Director del trabajo titulado "APOPTOSIS, CD95/FAS/APO-1 Y SU TRASCENDENCIA EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO HUMANO Y MURINO" del que es autora D<sup>a</sup>. Paula RAMOS NUÑEZ, considero que dicho trabajo cumple en grado máximo todos los requerimientos necesarios para ser defendido como trabajo de Tesis Doctoral.

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup>  
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

  
Fdo.: Prof. R. Patiño Barrios  
(fecha y firma)

D.N.I.: 32287178

  
Fdo.: Dr. J.A. Jover Jover  
(fecha y firma)

D.N.I.: 5340535

## INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

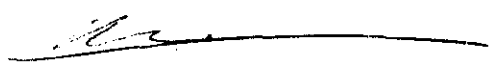
PROFESOR D. RAFAEL ENRIQUEZ DE SALAMANCA LORENTE, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORMA: que una vez examinado el Trabajo presentado por Dña. PAULA RAMOS NUÑEZ, titulado: "APOPTOSIS, CD95/FAS/APO-1 Y SU TRASCENDENCIA EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO HUMANO Y MURINO", dirigido por el Dr. JUAN ANGEL JOVER JOVER Y D. RAMON PATIÑO BARRIOS, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión  
Consejo Departamento

15 DIC. 1995

El Director del Departamento

  
Fdo.: Prof. Dr. R. Enriquez de Salamanca  
Fdo.: \_\_\_\_\_  
(fecha y firma)



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Juan Angel Jover Jover, Director de esta Tesis, y al Dr. Antonio Bañares Cañizares por iniciarme y estimularme con su ejemplo en mi formación clínica e investigadora.

Al Dr. Charles L. Christian, "Physician in Chief" del Departamento de Medicina del Hospital for Special Surgery, por admitirme en su programa de formación como "Fellow" en "Research" y "Pediatric Rheumatology".

Al Dr. Arturo Fernández Cruz, por animarme a realizar un programa en EEUU y facilitarme la admisión en el Hospital for Special Surgery.

Al Dr. Keith Elkon, Departamento de Medicina del Hospital for Special Surgery, verdadero promotor de este trabajo, por haberme embarcado en el apasionante mundo de la apoptosis y permitirme la realización de esta Tesis.

A Jia Li Chu, Andy Parnassa y Liang Zhou, del Hospital for Special Surgery, por haberme enseñado y ayudado durante tantas horas de trabajo.

Al Dr. Daniel Filippa, MaryAnn Gangi y Ann Baren, Departamento de Patología del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, por introducirme y ayudarme en las técnicas histológicas.

Al Hospital for Special Surgery y Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York por facilitarme todo lo necesario en mi trabajo investigador.

Al Hospital Ntra. Sra. de la Candelaria de Santa Cruz de Tenerife, con especial agradecimiento al Dr. José Antolín Arias y a los Dres. Manuel Brito Suárez, Cantabrana Alútiz y Roces Varela del Servicio de Reumatología sin cuyo apoyo no hubiera podido escribir esta Tesis en mi país.

Al Fondo de Investigación Sanitaria de la S.S., por haberme otorgado las becas B. A. E. expedientes 93/5147 y 94/5108 durante las cuales realicé esta Tesis.

## INDICE

●	<b>I. Introducción.</b>	3
●	<b>II. Objetivos.</b>	7
●	<b>III. Revisión bibliográfica.</b>	
	• 1. Apoptosis.	11
	• 2. Genes involucrados en la apoptosis.	21
	• 3. El receptor Fas y su ligando.	29
	• 4. Modelos murinos de Lupus Eritematoso Sistémico.	
	Mutaciones <i>lpr</i> , <i>gld</i> y <i>lpr<sup>eg</sup></i> .	37
	• 5. Muerte linfocitaria mediada por Fas.	48
	• 6. Lupus Eritematoso Sistémico humano y apoptosis.	54

<b>● IV. Aportación personal.</b>	<b>60</b>
<b>IV. 1 Material y métodos.</b>	
• 1. 1 Estudios en ratones.	62
• 1. 2 Estudios en humanos.	84
<b>IV. 2 Resultados.</b>	
• 2. 1 Estudios del receptor Fas en ratones.	92
2. 1. 1 Análisis citométrico.	92
2. 1. 2 Estudios histológicos.	110
• 2. 2 Estudios del ligando del Fas en ratones.	122
• 2. 3 Estudios del receptor APO-1 en humanos.	133
<b>IV. 3 Discusión.</b>	
• 3. 1 Estudios del receptor Fas en ratones.	149
• 3. 2 Estudios del ligando del Fas en ratones.	162
• 3. 3 Estudios del receptor APO-1 en humanos.	173
<b>IV. 4 Conclusiones.</b>	
<b>● V. Bibliografía.</b>	<b>184</b>
<b>● VI. Abreviaturas.</b>	<b>209</b>



# **I. INTRODUCCION**

La homeostasis celular en el sistema linfoide está regulada por la tasa de proliferación, diferenciación y muerte celular. El conocimiento de los mecanismos que conducen a la muerte celular es relevante para entender la etiopatogenia de las enfermedades autoinmunes. La apoptosis es una forma de muerte celular que permite la eliminación de células senescentes, en exceso o que pueden ser potencialmente nocivas para el organismo sin perjuicio del microambiente celular <sup>1</sup>. La apoptosis tiene una función crucial en el desarrollo y funcionamiento de un sistema inmune eficaz. Las células del sistema inmune están probablemente programadas para morir si no son reclutadas en una respuesta inmune.

La apoptosis está regulada por genes que promueven la muerte celular, como CD95/Fas/APO-1, y genes que la previenen. La proteína Fas se expresa predominantemente en la superficie celular de linfocitos inmaduros y en linfocitos maduros activados <sup>2,3</sup>. La unión del receptor Fas a su ligando desencadena la muerte celular del linfocito por apoptosis <sup>4</sup>.

Las enfermedades autoinmunes se clasifican en órgano-específicas o multisistémicas, la enfermedad prototipo de estas últimas sería el lupus eritematoso sistémico (LES). Mientras el origen de las enfermedades órgano-específicas podría deberse a un mecanismo de mimetismo molecular, parece más probable que las

multisistémicas, caracterizadas por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra una gran variedad de antígenos celulares, se deban a un defecto en los mecanismos de la tolerancia inmunológica. Los estudios genéticos han revelado que el LES, tanto en humanos como en modelos animales, es una enfermedad poligénica condicionada por factores ambientales. No se han identificado los genes o mecanismos moleculares que conllevan a un defecto de la tolerancia en el LES en humanos.

La importancia de la apoptosis en el LES ha despertado un reciente interés tras el descubrimiento de tres mutaciones independientes que afectan al gen del receptor CD95/Fas/APO-1 o su ligando en tres cepas murinas diferentes (MRL/lpr, CBA/lpr<sup>cg</sup> y C3H/gld) que fenotípicamente desarrollan manifestaciones autoinmunes similares al LES humano. En estas cepas murinas se ha demostrado que existe una prolongada supervivencia de los linfocitos en relación a las mutaciones del gen del receptor Fas o su ligando lo que conduce a un defecto en la tolerancia inmunológica y en consecuencia al desarrollo de autoinmunidad <sup>5, 6</sup>.

El reconocimiento de la importancia de la apoptosis, los genes involucrados en la misma y sus mecanismos reguladores en la patogenia de las enfermedades autoinmunes suponen un campo de investigación que abre un fértil horizonte hacia nuevas posibilidades terapéuticas de las enfermedades autoinmunes.

En el presente trabajo nos proponemos estudiar la expresión y funcionalidad del receptor Fas y su ligando en modelos murinos de LES que presentan mutaciones para estas proteínas y en cepas murinas normales. Asimismo, analizaremos la expresión y *funcionalidad del receptor APO-1 en el LES humano e individuos sanos*. Finalmente, proponemos en la discusión el posible papel del Fas en la tolerancia inmunológica y su implicación en el desarrollo de la autoinmunidad.

## **II. OBJETIVOS**

Objetivo general: profundizar en el conocimiento de la patogenia del LES. Estudiar el papel que los mecanismos de control de la supervivencia y muerte celular pueden tener en el desarrollo de los fallos de la tolerancia inmunológica que favorezcan la aparición de las enfermedades autoinmunes.

Objetivos específicos:

- 1.- Describir y comparar la distribución de la proteína FasR en órganos linfoides y no linfoides de ratones normales y de ratones que desarrollan espontáneamente manifestaciones autoinmunes similares al LES humano.
- 2.- Analizar los cambios en la expresión de la proteína FasR en linfocitos de órganos linfoides de ratones normales y ratones autoinmunes en situación basal y tras activación "in vitro" y determinar si la expresión del FasR se modifica en relación a la edad del ratón y al desarrollo de las manifestaciones autoinmunes.
- 3.- Analizar la expresión del ARNm del FasL en órganos linfoides de ratones normales y mutantes.
- 4.- Estudio de la funcionalidad del FasL en linfocitos de ganglios linfáticos de ratones mutantes.

- 5.- Estudiar la expresión basal del FasR en células mononucleares de sangre periférica y poblaciones linfocitarias de pacientes con LES y determinar si la expresión del FasR se correlaciona con la actividad de la enfermedad.
- 6.- Analizar si existe un cambio en la expresión del FasR en células mononucleares de sangre periférica activadas "in vitro" en pacientes con LES y controles sanos.
- 7.- Realizar estudios funcionales del FasR en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con LES y controles sanos.

### **III. REVISION BIBLIOGRAFICA**



## • 1. APOPTOSIS

Está generalmente aceptado que las células tienen mecanismos internos que dictaminan su división, pero no es hasta la década de los 80 cuando se evidencia que en las células también existen mecanismos internos capaces de desencadenar su muerte. Dos son los mecanismos principales de muerte celular en las células nucleadas eucariotas, cada uno de características morfológicas y bioquímicas distintas: necrosis y apoptosis <sup>7</sup>.

El primer mecanismo descrito históricamente es la **necrosis**, que ocurre cuando cualquier célula es expuesta a un daño patológico como hipoxia, isquemia, lesión de la membrana mediada por el complemento, hipertermia, traumatismo físico o químico. El órgano diana celular es en este caso la mitocondria, que experimenta fenómenos inflamatorios con formación de precipitados en su interior, lo que la hace incapaz de continuar con la producción energética que mantiene las bombas iónicas celulares. Se produce por tanto un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, la célula aumenta de tamaño y finalmente la membrana y todas las organelas citoplasmáticas se desintegran vertiéndose el contenido celular en el espacio intercelular. Se desencadena entonces una respuesta inflamatoria tisular que tiene por objeto la eliminación de los restos celulares <sup>7</sup>. En el proceso de la necrosis celular no se requiere la síntesis de proteínas. La necrosis es en realidad el resultado de la incapacidad de la célula para

controlar una agresión súbita y extensa que procede del exterior celular.

En 1972, Kerr et al <sup>1</sup> acuñaron el término **apoptosis**, que procede del griego y hace referencia a la caída de las hojas de los árboles en otoño. Aunque olvidado por algún tiempo, se ha convertido en un vocablo extensamente usado entre los investigadores de esta década. El reciente progreso en el conocimiento de su funcionamiento ha sido una gran revelación en los mecanismos del comportamiento celular. Apoptosis es sinónimo de muerte celular programada, pero hay que matizar que no todas las células que mueren por apoptosis están desde siempre programadas a morir, es más apropiado considerar que la célula tiene la capacidad de poner en marcha en cualquier momento un programa de muerte suicida en respuesta a determinadas circunstancias.

**Morfológicamente**, la apoptosis se caracteriza porque el órgano diana es el núcleo celular, existe una condensación de la cromatina con marginación de la misma alrededor de la membrana nuclear. La célula globalmente se encoge, pierde contacto con las membranas celulares en vecindad y desaparecen elementos especializados de la superficie celular como microvilli o uniones intercelulares <sup>8</sup>. La mitocondria y el resto de organelas citoplasmáticas permanecen intactas. La membrana nuclear desarrolla invaginaciones que segmentan el núcleo. La membrana celular también se invagina formando vesículas, proceso que se conoce como zeiosis en referencia al burbujeo de

la levadura en una tinaja de cerveza. Como resultado se originan segmentos celulares rodeados por membrana celular que contienen organelas intactas, los llamados cuerpos apoptóticos<sup>9</sup>. Estos son reconocidos y fagocitados por macrófagos fundamentalmente, aunque cualquier célula puede hacerlo; así, es posible ver células epiteliales o tumorales fagocitando a sus vecinas. Vitronectina, CD ("cluster of differentiation", grupos de diferenciación)<sup>36</sup> y tombospondina son algunas moléculas de los fagocitos que reconocen la fosfatidilserina expuesta en la superficie de las células apoptóticas<sup>10</sup>. Es importante destacar que no existe liberación del contenido celular ni de enzimas proteolíticos al medio extracelular, de modo que no se produce una respuesta inflamatoria. Tampoco existe daño de las células vecinas, la apoptosis es un proceso selectivo de muerte de una célula en el seno de un tejido vivo<sup>11</sup>.

**A nivel molecular** destaca un hecho característico. En la necrosis el ácido desoxirribonucleico (ADN) se degrada aleatoriamente. En la apoptosis la ruptura del ADN sigue un patrón preciso. Primero aparecen fragmentos muy grandes de entre 300 a 50 kilopares de bases<sup>12</sup>. Posteriormente el ADN es degradado por endonucleasas endógenas en fragmentos de 180-200 pares de bases o múltiplos que corresponden al tamaño de un nucleosoma, este patrón obedece a la mayor vulnerabilidad del ADN entre los nucleosomas. Esto origina el característico patrón "en escalera" que se observa en los geles de agarosa<sup>13</sup>. No se conocen los enzimas responsables de la primera fragmentación. Se han descrito algunas endonucleasas endógenas con actividad

---

nucleosomal dependientes de calcio y magnesio e inhibidas por zinc <sup>14</sup>. En timocitos y ganglios linfáticos de rata se ha observado una actividad endonucleasa funcional y antigénicamente indistinguible de la desoxirribonucleasa I (ADNasa I) <sup>15</sup>, lo que sugiere que ésta sea una endonucleasa responsable de la apoptosis en mamíferos.

La apoptosis es un proceso de muerte fisiológica cuya función primordial es eliminar células que han cumplido su cometido y que ya no son necesarias o que funcionan anormalmente pudiendo ser incluso dañinas para el organismo. La maquinaria que controla la apoptosis debe estar adecuadamente regulada, un defecto en dicha regulación puede traducirse en patología, tanto por la inhibición como por un exceso <sup>16,17</sup>.

La apoptosis es un proceso fisiológico filogénicamente conservado desde los animales invertebrados hasta los mamíferos durante la **metamorfosis y el desarrollo embriológico** <sup>18</sup>. En mamíferos se ha observado durante la diferenciación del sistema nervioso, tubo digestivo, cartilago y huesos, también participa la apoptosis en la involución de la membranas interdigitales y de los conductos de Müller que determinan el sexo.

En los **tejidos adultos normales**, la apoptosis interviene en la homeostasis y recambio celular de una forma coordinada sin que se produzca una ruptura en la arquitectura global. Así, las células epiteliales superficiales del tubo digestivo, que están

expuestas a los carcinógenos de la dieta, mueren por apoptosis. Lo mismo sucede en las células epiteliales de la piel expuestas a las radiaciones ultravioleta (UV) <sup>17</sup>. Otros ejemplos son las células dependientes de hormonas tróficas como endometrio, mama, folículos ováricos y túbulos seminíferos <sup>17</sup>.

En el **sistema inmune**, dada la masiva producción diaria de linfocitos en la médula ósea y su expansión clonal en la periferia, debe de existir una tasa equivalente de muerte celular que se produce tanto en el timo como en la periferia por apoptosis. Los principios básicos que determinan el destino de un linfocito están expresados en la figura 1. Los linfocitos autorreactivos y los que no tienen ninguna función porque no son capaces de reconocer el sistema mayor de histocompatibilidad son eliminados por apoptosis en el timo <sup>19</sup> (tolerancia central). Los linfocitos maduros que no son reclutados en una respuesta inmune mueren por apoptosis <sup>20</sup> y los linfocitos que desarrollan una respuesta frente a antígenos externos sobreviven hasta que cumplen su función y luego se suicidan (tolerancia periférica).

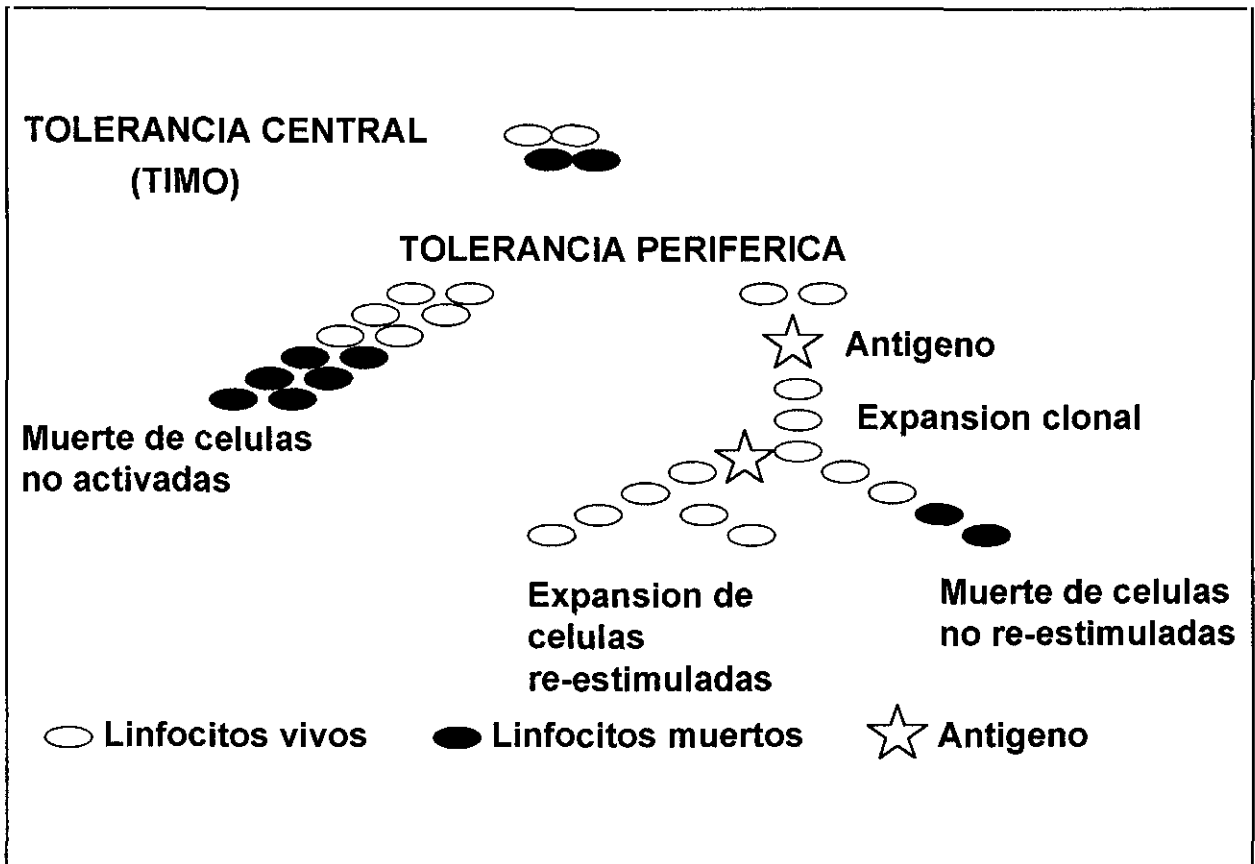


Figura1. Regulación de la supervivencia de linfocitos.

Se han tratado de implicar defectos de apoptosis en la patogenia de las **enfermedades autoinmunes** <sup>21</sup>. En el sistema inmune hay muchos ejemplos de muerte celular programada <sup>22</sup>. Cuando los timocitos inmaduros y los linfocitos maduros activados son estimulados con anticuerpos monoclonales anti-CD3 o anti-TCR (receptor de la célula T) mueren por apoptosis, mientras que por el contrario los linfocitos maduros en reposo desarrollan una respuesta proliferativa ante el mismo estímulo <sup>23-25</sup>. Murphy et al <sup>26</sup> demostraron que se producía apoptosis en los timocitos CD4+CD8+TCR<sup>lo</sup> de ratones transgénicos para un TCR que reconoce un péptido de ovoalbúmina en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II cuando se les inyecta intraperitonealmente dicho péptido. La delección clonal de timocitos y células B autorreactivas ocurre por un proceso de apoptosis <sup>22</sup>. En las células T maduras se ha demostrado que el pretratamiento con anticuerpos anti-CD4 y posterior unión del TCR induce apoptosis <sup>27</sup>. También se produce apoptosis en las células diana de los linfocitos citotóxicos o los linfocitos "natural killer" (asesinos naturales) <sup>28</sup>. Algunos hibridomas de células T mueren por apoptosis tras activación vía TCR <sup>29</sup>. Líneas celulares dependientes de factores de crecimiento mueren por apoptosis cuando son deprivadas de estos factores <sup>30</sup>. El tratamiento "in vitro" con glucocorticoides induce muerte por apoptosis en timocitos <sup>13, 31</sup>.

Estudios "in vitro" previos han sugerido que ante los estímulos adecuados, los timocitos pasan directamente de ser morfológicamente normales a apoptóticos. Cohen

et al <sup>32</sup> identificaron una población transicional de timocitos preapoptóticos de tamaño y densidad intermedios entre timocitos normales y apoptóticos y que además presentan una expresión menor de CD4 y CD8 cuando se comparan con timocitos normales. A nivel ultraestructural, presentan grumos de cromatina condensada contiguos a la membrana nuclear. Así, consideraron que estas células se encontraban en un estadio temprano de apoptosis porque presentaban cambios morfológicos y bioquímicos de apoptosis pero sin rotura internucleosomal del ADN, cambio que aparecía posteriormente en el tiempo. Posteriormente, estos mismos autores <sup>33</sup> observaron que en la población de timocitos preapoptóticos se forman inicialmente grandes fragmentos de ADN de 30-50 Kilopares de base con un incremento máximo a la hora de ensayo, apareciendo entre las 2-4 horas los fragmentos internucleosomales. Concluyeron que estos grandes fragmentos de ADN serían el evento más precoz e irreversible de apoptosis.

En las **neoplasias** existiría una ruptura en la homeostasis en el sentido de una proliferación inapropiada. Probablemente una primera alteración se produciría a nivel de los genes que controlan la muerte celular programada. Esto induciría una supervivencia celular prolongada que aumentaría las posibilidades de adquirir defectos genéticos adicionales bien en los genes que controlan el crecimiento y la proliferación o bien en los genes de supresión tumoral <sup>34</sup>.

Por otra parte, un **exceso de apoptosis** también ha sido implicado en situaciones



patológicas. Algunos procesos degenerativos del sistema nervioso central como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson se han asociado a una muerte neuronal prematura por apoptosis <sup>34</sup>. También se ha observado un incremento de apoptosis en síndromes mielodisplásicos, en algunas formas de anemia aplásica <sup>34</sup>, en el rechazo de transplantes y en la pérdida de tejido renal en la poliquistosis renal <sup>35</sup>.

La apoptosis también está involucrada en los mecanismos de muerte celular de los linfocitos CD4 en el **síndrome de inmunodeficiencia adquirida** (SIDA). Groux et al <sup>36</sup> observaron que selectivamente los linfocitos CD4 de pacientes asintomáticos con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mueren por apoptosis tras estimulación con superantígenos o mitógeno "pockeweed" (PWM). Meyaard et al <sup>37</sup> demostraron que los linfocitos T CD4 y CD8 de pacientes asintomáticos infectados con el VIH mueren por apoptosis tras activación en cultivo con anticuerpos anti-CD3, aunque no encontraron correlación entre el porcentaje de células apoptóticas y el estadio clínico de la infección VIH <sup>38</sup>. Finkel et al <sup>39</sup> observaron que en ganglios linfáticos de niños infectados con VIH, la apoptosis se produce en células no infectadas y no se produce en las células infectadas, probablemente porque el VIH codifica para una proteína que inhibe la muerte de la célula huésped lo que obviamente es ventajoso para el virus. Muro-Cacho et al <sup>40</sup> observaron que el grado de apoptosis en ganglios linfáticos de individuos infectados con el VIH era 3-4 veces superior al de los controles no infectados y no se correlacionaba con el estadio clínico de la infección por VIH. Li et al <sup>41</sup> encontraron que la proteína

transactivadora Tat del VIH-1 induce la apoptosis de la línea celular T Jurkat y de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos.

Un mejor conocimiento de los mecanismos a nivel genético de la apoptosis podría tener consecuencias terapéuticas beneficiosas. Se podrían desarrollar agentes terapéuticos que actuaran selectivamente estimulando la apoptosis de células tumorales o linfocitos autorreactivos o inhibiéndola en el caso de los linfocitos infectados por el VIH.

## • 2. GENES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso activo. Tras la llegada de una señal al genoma, se induce la expresión de nuevos genes y síntesis de proteínas <sup>42</sup>, aunque algunas células pueden sufrir apoptosis en presencia de inhibidores de la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas <sup>43</sup>. Se han descrito varios productos génicos involucrados en la apoptosis entre los que caben destacar los siguientes.

El oncogen **Bcl-2** ("B cell lymphoma associated break point 2", linfoma de células B asociado al punto de ruptura 2) es un supresor de muerte celular o anti-apoptosis. Fue descrito en la translocación t(14;18) (q32;q21) en la que el gen Bcl-2 situado en la banda q21.3 del cromosoma 18 es translocado junto al locus de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas en el cromosoma 14, de forma que se transcriben grandes cantidades de Bcl-2 <sup>44</sup>. La t(14;18) es el marcador citogenético del 80% de los linfomas foliculares y del 20% de los difusos <sup>45</sup>. Bcl-2 es capaz de inhibir apoptosis "in vitro" ante diversos estímulos: radiación, hipertermia, deprivación de factores de crecimiento, glucocorticoides y drogas quimioterápicas <sup>46</sup>. El gen Bcl-2 codifica para un proteína citoplasmática de 25 kilodáltones (kd) asociada inicialmente a la membrana mitocondrial interna <sup>46</sup>. Posteriormente se ha localizado también en la membrana mitocondrial externa, membrana nuclear y retículo endoplásmico <sup>47</sup>. Precisamente en estas localizaciones

celulares tiene lugar el transporte electrónico y es donde se generan radicales libres de oxígeno. Esto llevó a Hockenbery et al <sup>48</sup> a indagar sobre la generación de radicales libres de oxígeno durante la apoptosis y el posible papel de Bcl-2 como antioxidante. Usando células de estirpe linfoide, demostraron que tras una señal apoptótica, las células sufrían una progresiva peroxidación de los lípidos de la membrana y que la hiperexpresión de Bcl-2 suprimía completamente esta peroxidación. Kane et al <sup>49</sup> llegaron a la misma conclusión utilizando una línea celular hipotalámica. Esta acción antioxidante de Bcl-2 está avalada por experimentos realizados con ratones deficientes en Bcl-2 <sup>50</sup>. En estos ratones el desarrollo embriológico es normal pero existe un retraso del crecimiento, una mortalidad temprana por daño renal por riñones poliquísticos y una masiva involución apoptótica de bazo y timo. Además, el pelo de estos ratones se vuelve gris en el segundo ciclo del folículo piloso. Estos hallazgos son explicados por Veis et al <sup>50</sup> como el resultado de la pérdida de la función antioxidante de Bcl-2, necesaria para el mantenimiento del sistema inmune pero no para su desarrollo. Sin embargo, Jacobson y Raff <sup>51</sup> y Shimizu et al <sup>52</sup> observaron con posterioridad que los radicales libres de oxígeno no son una parte esencial de la apoptosis y que Bcl-2 protege también de la muerte celular programada en condiciones anaerobias. Jacobson et al <sup>47</sup> también demostraron que líneas celulares mutantes humanas que carecen de ADN mitocondrial y por tanto no tienen una cadena respiratoria funcional pueden sufrir apoptosis y ésta puede ser inhibida por Bcl-2, lo que sugiere que ni la apoptosis ni el efecto protector de Bcl-2 dependen de la respiración mitocondrial. También Jacobson et al <sup>53</sup> mostraron en

un estudio ulterior que citoplastos carentes de núcleo celular pueden sufrir apoptosis de la cual pueden ser protegidos por Bcl-2, lo que indica que en algunos casos el núcleo celular no es necesario en la apoptosis ni en la acción de Bcl-2. En este último trabajo se propone que la apoptosis debe estar controlada por un regulador citoplasmático con *múltiples órganos diana intracelulares*. Sin embargo, se han observado características morfológicas de apoptosis en núcleos aislados en un sistema libre de células en presencia de fragmentos de organelas, siendo esta apoptosis inhibida en presencia de Bcl-2 <sup>54</sup>.

La proteína codificada por Bcl-2 presenta una distribución topográfica restringida a tejidos donde existe muerte por apoptosis, como los centros germinales de los ganglios linfáticos y la médula tímica <sup>55</sup>. Esto sugiere que el Bcl-2 tiene un papel en la supervivencia de los linfocitos. Sentman et al <sup>56</sup> crearon ratones transgénicos que expresaban Bcl-2 en los timocitos corticales, lo que protegió a estos timocitos de estímulos inductores de apoptosis como corticoides, radiaciones o anticuerpos anti-CD3 a los que habitualmente son vulnerables, pero no modificó los procesos de selección negativa. Strasser et al <sup>57</sup> obtuvieron resultados similares en ratones transgénicos que expresaban Bcl-2 en los linfocitos T. Strasser et al <sup>58</sup> también demostraron que ratones que expresaban el transgen Bcl-2 en linfocitos B desarrollaban manifestaciones autoinmunes similares al lupus eritematoso sistémico (LES), lo que no sucedía en los transgénicos para Bcl-2 en células T.

Un modelo "in vivo" de la acción de Bcl-2 es el nematodo **Caenorhabditis Elegans**. De las 1090 células somáticas que se forman en el desarrollo del gusano adulto, 131 mueren por apoptosis. La expresión del Bcl-2 humano en los embriones de los gusanos produce una disminución significativa del número de células apoptóticas <sup>59</sup>. Como normalmente la apoptosis en el *Caenorhabditis Elegans* está controlada por el gen *ced-9* (*ced*, por "cell death", muerte celular), el hecho de que el Bcl-2 prevenga la muerte programada sugiere que *ced-9* y Bcl-2 son homólogos. En el *Caenorhabditis Elegans*, los genes *ced-3* y *ced-4* promueven apoptosis mientras que *ced-9* antagoniza esta acción. El gen *ced-3* codifica para una proteasa y comparte una función y secuencia homólogas con el enzima convertidor de interleuquina 1 $\beta$  (ICE) humano <sup>60</sup>. Hasta hoy no se ha encontrado un homólogo humano del gen *ced-4*.

Diversos autores han encontrado separadamente genes relacionados con Bcl-2 <sup>61</sup>. Boise et al <sup>62</sup> clonaron el gen **Bcl-x**, el cual está altamente conservado en la evolución de los vertebrados. Bcl-x codifica para dos proteínas distintas por una división alternativa de su ARN mensajero (ARNm). El producto del ARNm más largo, Bcl-x<sub>L</sub>, es similar en tamaño y estructura a Bcl-2 e inhibe muchas formas de apoptosis. Bcl-x<sub>S</sub>, el producto más corto, actúa por el contrario inhibiendo al Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. Se ha encontrado Bcl-x<sub>S</sub> en timocitos inmaduros, lo que explicaría la incapacidad de Bcl-2 para inhibir la muerte por selección negativa de estas células. Bcl-x<sub>L</sub> se expresa constitutivamente en neuronas maduras, contribuyendo a su viabilidad a largo plazo y su resistencia a la muerte por

apoptosis. Oltvai et al <sup>63</sup> identificaron una proteína de 25 kd que tiene una gran homología en la secuencia de aminoácidos con Bcl-2 a la que llamaron **Bax**. Bax forma homodímeros y heterodímeros con Bcl-2 "in vivo" y ambos guardan una interacción dinámica de forma que cuando predomina Bax se produce apoptosis y se contrarresta la acción de Bcl-2 y cuando predomina Bcl-2 sucede lo contrario. Tres grupos de autores describieron independientemente un nuevo gen llamado **Bak** (por Bcl-2 homólogo antagonista / "killer", asesino) que es homólogo a Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> y es un inductor de apoptosis <sup>64-66</sup>. **BAG-1** (por Bcl-2-asociado athanogen 1) es un gen anti-apoptosis no homólogo a Bcl-2 descrito por Takayama et al <sup>67</sup>. La co-expresión de BAG-1 y Bcl-2 aumenta la protección celular a la apoptosis inducida por varios estímulos, incluyendo anticuerpos contra el receptor Fas, que su expresión por separado <sup>67</sup>.

El proto-oncogen **c-myc** actúa como factor de transcripción normalmente asociado a inducción de la proliferación celular, pero también se asocia a algunas formas de apoptosis. Así, fibroblastos que hiperexpresan c-myc son más proclives a sufrir apoptosis tras privación de suero de ternera fetal en el medio de cultivo <sup>68</sup>. El c-myc induce apoptosis tras la activación celular cuando forma heterodímeros con la proteína intracelular Max <sup>69</sup>. El c-myc ejerce su función controlado por otros genes como Bcl-2. El gen Bcl-2 bloquea la apoptosis inducida por c-myc pero no la proliferación celular <sup>70,71</sup>.

El gen **p53** actúa como supresor tumoral evitando el crecimiento celular mediante mecanismos transitorios y permanentes. De forma transitoria y reversible, detiene el ciclo celular de una célula dañada en la fase G1 ("gap 1" o intervalo 1 es la fase celular quiescente entre las fases de mitosis y síntesis de ADN) mientras el daño es reparado. Mutaciones del p53 pueden promover cáncer permitiendo que células dañadas continúen su replicación antes de que el daño sea reparado. Se han encontrado mutaciones de p53 en una gran variedad de tumores malignos tales como los de mama, pulmón y colon. En otros casos, la hiperexpresión de p53 normal desencadena irreversiblemente la apoptosis<sup>72</sup>, como sucede en líneas celulares mieloides y epiteliales. Clarke et al<sup>73</sup> y Lowe et al<sup>74</sup> demostraron independientemente que los timocitos murinos requieren expresión del p53 para la inducción de apoptosis mediada por radiación ionizante o etopósido (estabiliza el complejo topoisomerasa II-ADN durante el proceso de rotura-unión en la síntesis del ADN, con lo que se forman fragmentos de ADN que no se sellan) pero no para la mediada por forbol miristato acetato (PMA) / ionomicina (mimetiza la unión al receptor de la célula T) o glucocorticoides. Estos hallazgos tienen una gran trascendencia terapéutica. Lowe et al<sup>75</sup> observaron que la presencia de mutaciones de p53 en células tumorales se correlacionaba con una respuesta pobre al tratamiento con radiación o quimioterapia. Posteriormente Strasser et al<sup>76</sup> observaron que Bcl-2 bloqueaba la apoptosis inducida por p53 y que en algunos tumores la mala respuesta al tratamiento dependía más de una elevada expresión de Bcl-2 que de una pérdida de p53.



El **Nur77** es un miembro de la familia de receptores para hormonas esteroideas/tiroideas que incluye a los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, hormonas sexuales, ácido retinoico, hormona tiroidea y vitamina D <sup>77</sup>. Fue descrito por Christy et al en 1988 <sup>78</sup> como un gen que es rápida y transitoriamente activado en células estimuladas y que codifica para una proteína con tres anillos de zinc típica de los factores de transcripción. El Nur77 transmite apoptosis mediada específicamente por unión al TCR / CDC3 en hibridomas de células T y en células T inmaduras pero no en células T en crecimiento o activadas <sup>79,80</sup>. Además de su inducción durante la muerte celular, el Nur77 también es inducido durante la activación. Sin embargo, el ARNm del Nur77 inducido tras la activación celular carece de la cola de poli-adenosina que sí presenta cuando es inducido tras la muerte celular, lo que puede dar lugar a cambios en la transcripción de la proteína <sup>81</sup>.

El **enzima convertidor de la interleuquina 1 $\beta$  (ICE**, "interleukin 1 $\beta$  converting enzyme") es una proteasa que contiene cisteína y que activa la interleuquina 1 (IL1), un importante mediador de la inflamación, al convertir pro-IL1 $\beta$  en su forma biológicamente activa IL1 $\beta$  rompiendo residuos de aspartato. La hiperexpresión del ICE causa apoptosis en fibroblastos de rata que es inhibida por el Bcl-2 <sup>82</sup>. Recientemente se ha demostrado que anticuerpos contra el receptor Fas <sup>83, 84</sup>, y más lentamente el factor de necrosis tumoral (FNT) <sup>83</sup>, presentan actividad citotóxica sobre fibroblastos de rata que expresan el receptor Fas. Esta actividad puede ser inhibida si las células expresan el *crmA*, un gen

modificador de la respuesta de citoquinas codificado por el virus vacuna que específicamente inhibe al ICE <sup>84</sup>. Estos hallazgos sugieren que el ICE es una proteasa involucrada en la muerte celular mediada por el receptor Fas y por el FNT.

Estudios realizados en **Drosophila Melanogaster** llevaron al aislamiento del gen "reaper" que es capaz de integrar información de diferentes vías para activar la apoptosis. White et al <sup>85</sup> encontraron que una delección en el gen "reaper" bloquea todos los procesos de muerte celular programada que normalmente suceden durante la embriogénesis de *Drosophila* provocando que el embrión muera antes de nacer, lo que sugiere que la muerte celular es necesaria para el desarrollo de un animal normal. El gen "reaper" codifica para un péptido de 65 aminoácidos que no es homólogo a ninguna proteína conocida y su ARNm se expresa en células destinadas a sufrir apoptosis 1-2 horas antes de que comience el proceso. En mamíferos no se ha encontrado todavía ningún homólogo del gen "reaper".

Por último, nos centraremos en una pareja de moléculas inductoras de apoptosis objetivo del presente estudio, el receptor Fas (FasR) y su ligando (FasL).

### • 3. EL RECEPTOR FAS Y SU LIGANDO

El **receptor Fas/Apo-1/CD95** es una proteína de superficie celular descrito originalmente en células **humanas** en 1989 por dos grupos de investigadores de manera independiente. Yonehara et al <sup>86</sup>, interesados en los receptores del FNT, encontraron un receptor que inicialmente pensaron se trataba de un subtipo de receptor del FNT en una *línea celular fibroblástica diploide humana llamada FS-7*. De esta forma describieron un anticuerpo monoclonal murino inmunoglobulina (Ig) M dirigido contra un componente de superficie de células humanas que llamaron anticuerpo anti-**Fas** (por fibroblasto-asociado) con actividad citolítica indistinguible de la realizada por el FNT y sugirieron que la actividad citolítica del FNT estaba mediada por el antígeno de superficie celular Fas. Con el fin de caracterizar moléculas de superficie celular implicadas en el control del crecimiento de linfocitos malignos, Trauth et al <sup>2</sup> crearon anticuerpos monoclonales contra la *línea celular linfoblástica B humana SKW6.4*. Descubrieron así un anticuerpo monoclonal murino IgG3 que llamaron anti-**APO-1** (por apoptosis 1) que reaccionaba contra un antígeno de 52 kd de linfocitos T y B activados humanos, líneas celulares linfoides T y B malignas humanas y algunas células leucémicas y que producía la apoptosis de las mismas. Dhein et al <sup>87</sup> compararon la eficacia para inducir la apoptosis de distintos isotipos (IgG3, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgA) de anti-APO-1 y observaron que IgG3 era el más efectivo y que el fragmento F(ab')<sub>2</sub> era inefectivo. Además el anticuerpo

anti-APO-1 requería el entrecruzamiento de moléculas de APO-1 en la superficie celular con un anticuerpo secundario anti-ratón para inducir apoptosis<sup>87</sup>. Ninguno de estos dos anticuerpos, anti-Fas y anti-APO-1, requieren de la actividad del complemento para producir la lisis celular.

Al clonar el ADN complementario (ADNc) del FasR y APO-1, se demostró que su secuencia era idéntica y que se trataba de una glicoproteína de superficie de 48 kd. Itoh et al<sup>88</sup> aislaron el ADNc que codifica para el antígeno Fas humano de la línea celular de linfoma T humano KT-3. La secuencia prevista de nucleótidos de ADNc del FasR demostró que era un polipéptido de 319 aminoácidos con un único dominio transmembrana, siendo la parte amino-terminal extracelular y la carboxi-terminal intracelular. Posteriormente Oehm et al<sup>89</sup> aislaron el ADNc del antígeno FasR humano de la línea celular linfoblástica B SKW6.4, demostrando que la secuencia prevista de aminoácidos era idéntica a la del antígeno Fas.

Esta estructura del FasR/APO-1 es característica de las proteínas de membrana tipo I y es común en muchos receptores de factores de crecimiento. El dominio extracelular es rico en residuos de cisteína y muestra una gran similitud con la **familia de receptores FNT / FCN (Factor de Crecimiento Nervioso)**<sup>90</sup>. La homología media con otros miembros de la familia es de un 24-30%. Entre los miembros de esta familia se han descrito 12 receptores y 8 ligandos (Figura 2). Los receptores descritos de esta

familia son: FNT-R1 (55 kd), FNT-R2 (75 kd) (ambos encontrados en una gran variedad de células e involucrados en diversas acciones como la inflamación y la muerte de células tumorales), FCN de baja afinidad (expresado en neuronas e implicado en su diferenciación y supervivencia), CD40 (antígeno expresado en células B humanas activadas), OX40 (expresado en células T CD4 activadas de rata), CD27 (expresado en células T y en una subpoblación de células B activadas), CD30 (expresado en células de linfoma Hodgkin)<sup>91</sup>, 4-1BB (codifica una proteína de función desconocida encontrada en clones de células T), PV-T2 y PV-A53R (ambos productos del genoma de poxvirus que codifican formas solubles de receptores de FNT). Varios miembros de esta familia funcionan como promotores bien de supervivencia celular o bien de apoptosis dependiendo del tipo y estadio de maduración celular y de otros posibles factores ambientales<sup>91, 92</sup>. Así, la unión al CD40 tiene una acción mitogénica en células B activadas<sup>93</sup> y previene la apoptosis "in vitro" de células B de los centros germinales<sup>94</sup>.

Itoh y Nagata<sup>95</sup> identificaron un dominio en la región intracitoplasmática del FasR necesario para inducir apoptosis, con una secuencia de 68 aminoácidos significativamente similar a la región citoplasmática del receptor FNT tipo I, que también provoca apoptosis. A este dominio lo llamaron "**dominio de la muerte**". Además estos autores observaron que la delección de 15 aminoácidos de la región carboxi-terminal del FasR incrementaba su capacidad apoptótica, probablemente porque esta región ejerce una acción reguladora sobre el resto de la porción intracitoplasmática.

Posteriormente fue identificado el homólogo **murino** del FasR<sup>3</sup> a partir de la línea celular macrofágica murina BAM3 activada con lipopolisacárido (LPS). El antígeno FasR murino es una proteína de 306 aminoácidos con un peso molecular de 35 kd que contiene un único dominio transmembrana que divide la proteína en una región extracelular de 148 aminoácidos y una citoplasmática de 141 aminoácidos. La secuencia de nucleótidos y la secuencia prevista de aminoácidos del antígeno FasR murino es idéntica en un 58.5% y un 49.3% respectivamente a la del FasR humano. Se encontró una distribución tisular de ARNm del FasR murino en timo, hígado, ovario y corazón pero no se detectó en bazo, cerebro, médula ósea, testículo y útero<sup>3</sup>.

Además de presentarse como un receptor de membrana, el FasR también puede presentarse en forma soluble desprovisto de la región transmembrana<sup>96, 97</sup>.

El gen del FasR/APO-1 humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 10<sup>98, 99</sup> y el de ratón en el extremo distal del cromosoma 19<sup>3</sup>.

La característica más reseñable del FasR es que transmite una señal de muerte celular cuando se une a su ligando natural o a anticuerpos agonistas como anti-FasR o anti-APO-1<sup>100</sup>. La muerte celular mediada por el FasR presenta las características morfológicas de apoptosis. El FasR se expresa en la superficie de varias líneas celulares T y B<sup>2</sup> y en linfocitos T y B activados<sup>101</sup>.

Los **mecanismos intracelulares** que acontecen desde la unión al FasR en la membrana hasta que se produce la muerte celular son poco conocidos. La porción intracelular del FasR y el FNTR1 (receptor de FNT tipo I) presentan una homología de un 28% en un dominio de 65 kd que es responsable de la transmisión de la señal apoptótica en ambos receptores<sup>95, 102</sup>. Dada esta similitud, y como la señal transmitida por el FNTR1 está mejor caracterizada que la del FasR, se especuló que ambos receptores utilizaban vías comunes para transmitir apoptosis, sin embargo se demostró posteriormente que esta hipótesis era falsa<sup>103, 104</sup>. La señal del FNTR1 está acoplada a diferentes fosfolipasas entre las que se encuentra esfingomielinasa. La esfingomielinasa cataliza la hidrólisis de esfingomielina originando fosforilcolina y ceramida. La ceramida libre actúa como un mensajero intracelular que activa serina/treonina tirosin-kinasas. Se ha demostrado mediante estudios de manipulación farmacológica que el aumento en la disponibilidad de ceramida libre intracelular induce la fragmentación del ADN y la muerte celular por apoptosis<sup>105</sup> aunque también estimula la proliferación celular<sup>106</sup>. Cifone et al<sup>107</sup> y Gill et al<sup>108</sup> demostraron separadamente que la unión de un anticuerpo anti-FasR al FasR induce la activación de una esfingomielinasa ácida en líneas tumorales humanas que expresan el FasR, lo que origina la formación de ceramida. Eischen et al<sup>109</sup> también demostraron que la interacción con el FasR induce una rápida fosforilación de varias tirosin-proteínas. Sato et al<sup>110</sup> identificaron una tirosin-kinasa a la que llamaron FAP-1 ("Fas associated phosphatase", fosfatasa asociada a Fas) que interacciona con el dominio intracelular del FasR inhibiendo la transmisión de apoptosis inducida por el

FasR en una línea celular T. Estas observaciones en la transmisión de la señal del FasR explicarían porqué unas células son más susceptibles al FasR que otras y porqué el FasR en ciertas condiciones puede inducir activación celular <sup>111</sup>.

Rouvier et al <sup>112</sup> habían demostrado que la línea celular T citotóxica PC60-d10S, era capaz de producir la lisis de timocitos procedentes de ratones normales, ratones de las cepas MRL/++ y C57B1/6J-gld y líneas celulares que expresaban el FasR, pero no provocaba la lisis de timocitos de ratones MRL/lpr o de aquellas líneas celulares en las que no se expresaba el FasR. Además, esta actividad citotóxica era independiente de calcio. Concluyeron que la citotoxicidad mediada por PC60-d10S depende de la expresión del FasR en la célula diana, lo que sugiere que estas células efectoras deberían de expresar el **ligando del Fas**. Basándose en estos datos, Suda y Nagata <sup>113</sup> detectaron expresión del FasL en estas células PC60 usando una forma soluble del FasR construída mediante una proteína de fusión entre la fracción constante (Fc) de la IgG1 humana y la parte extracelular del FasR murino. El FasL fue clonado posteriormente a partir de ADNc de estas células <sup>4</sup>. PC60 es un hibridoma generado por la fusión entre una línea celular citotóxica murina y otra procedente de linfoma de rata; se demostró que el ADNc clonado se originaba del genoma de rata. La proteína FasL tiene 278 aminoácidos y un peso molecular de 40 kd. Mediante la técnica de "northern blot" se demostró que el ARNm del FasL se detectaba en esplenocitos de rata activados y en menor grado en timocitos activados. En órganos no linfoides se expresaba en testículo



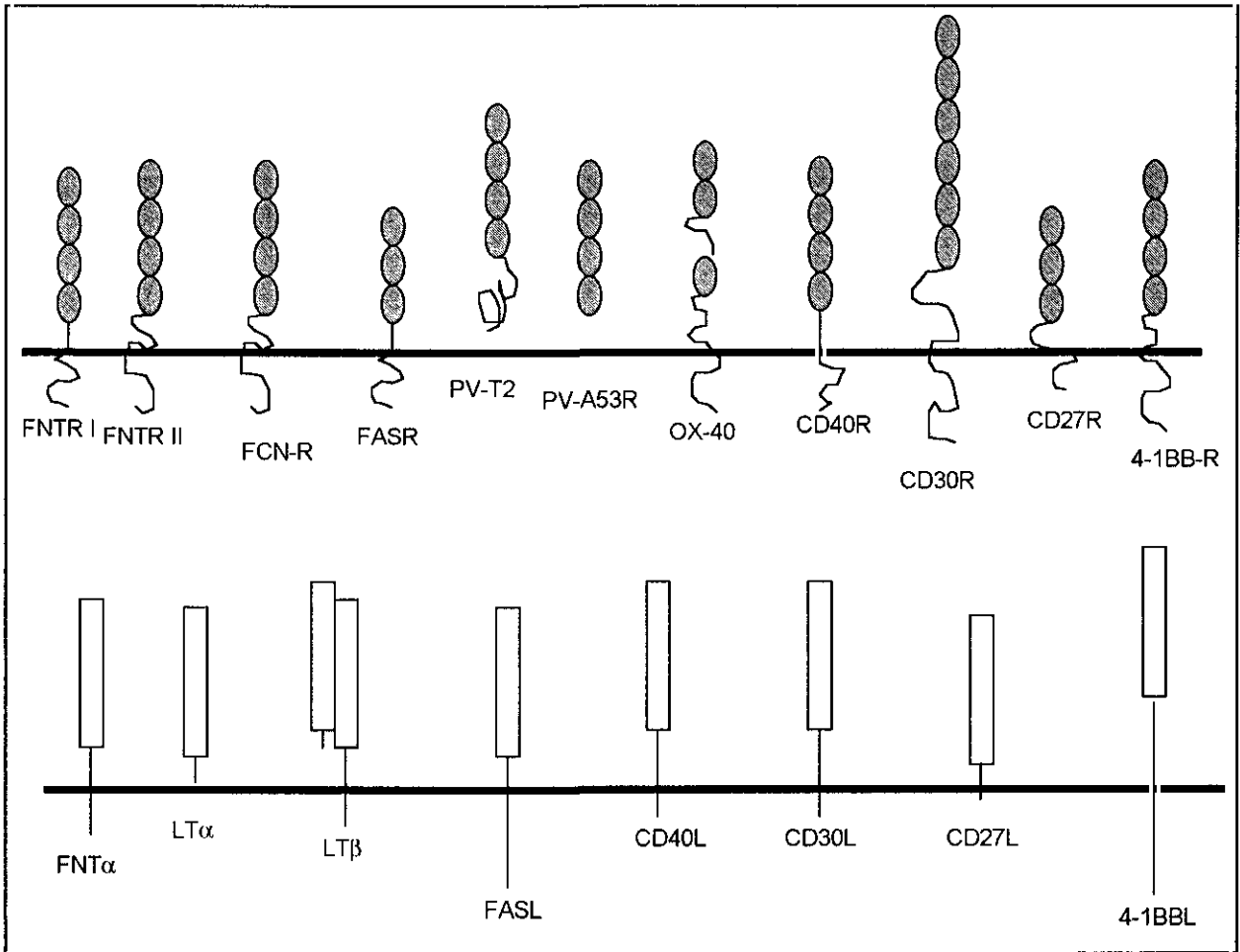
y con menor intensidad en intestino delgado, riñón y pulmón de rata <sup>4</sup>. Sin embargo, el FasL no se expresaba en testículo humano <sup>114</sup>. Además, el FasL no sólo se detectaba en la superficie celular de células transfectadas con el FasL sino que puede existir como una forma soluble también capaz de inducir apoptosis <sup>114</sup>.

La secuencia de aminoácidos del FasL demuestra que es una proteína transmembrana tipo II con una región extracelular carboxi-terminal y una intracelular amino-terminal. El FasL tiene una región de 150 aminoácidos en el dominio extracelular homólogo a la familia de ligandos FNT $\alpha$ , FNT $\beta$ , LT $\beta$ , CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, con una mayor similitud a los tres primeros <sup>4</sup> (Figura 2).

Posteriormente Takahashi et al <sup>6</sup> caracterizaron la secuencia del FasL murino, que presentaba una homología del 90.6% y del 91.4% en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos respectivamente con respecto al FasL de rata. El FasL murino y el humano presentan una homología en la secuencia de aminoácidos del 76.9% y carecen de especificidad de especie <sup>115</sup>. El gen del FasL murino y humano está localizado en la región distal del cromosoma 1 <sup>115</sup>.

Dhein et al <sup>116</sup>, Brunner et al <sup>117</sup> y Ju et al <sup>118</sup> describieron separadamente que la activación de células T mediante unión al TCR, inducía la co-expresión del FasR y el FasL. La interacción del FasR y su ligando en la misma célula inducía la muerte celular

de forma "suicida". Alderson et al <sup>119</sup> describieron que el FasL se expresaba en clones celulares T humanos activados con un incremento máximo de expresión 1 hora tras estimulación y que estos clones activados presentaban actividad citotóxica frente a células que expresaban el FasR.



**Figura 2.** Familia FNT / FCN de receptores (arriba) y ligandos (abajo).

• 4. **MODELOS MURINOS DE LES. MUTACIONES *lpr*, *gld* y *lpr<sup>cg</sup>*.**

Existen diferentes cepas murinas endogámicas que desarrollan espontáneamente manifestaciones autoinmunes similares al LES humano <sup>120</sup>. Desde un punto de vista experimental, la disponibilidad de estas cepas murinas ha servido como modelo para la realización de estudios de patología, inmunología y biología molecular de gran ayuda para elucidar la naturaleza de esta enfermedad. El conocimiento de la etiopatogenia del lupus murino conlleva una mejor comprensión de esta enfermedad en humanos así como de los mecanismos de autoinmunidad e inmunorregulación en general. La identificación de las mutaciones genéticas murinas *lpr* y *gld* constituyen una buena ilustración de la utilidad de estos modelos.

*lpr* y *gld* son mutaciones espontáneas murinas no alélicas autosómicas recesivas situadas en distintos locus que inducen la aparición de fenotipos clínicamente similares con manifestaciones autoinmunes (Figura 3). Ambas fueron identificadas originalmente en los Laboratorios Jackson. Estos dos modelos animales representan las primeras enfermedades autoinmunes en las que se conocen anomalías genéticas subyacentes.

La mutación ***lpr*** (linfoproliferación) se desarrolló espontáneamente en la cepa

murina MRL. La cepa MRL (H-2k) se originó tras entrecruzamiento de varias cepas murinas endogámicas procediendo su genoma de las siguientes cepas: 75% LG/J, 12.6% AKR/J, 12.1% C3H/Di y 0.3% C57BL/6J. Tras varias generaciones de endogamia, se vió que algunos ratones desarrollaban adenopatías masivas que posteriormente se identificaron ligadas a la presencia de una mutación llamada *lpr*, estos ratones se denominaron MRL/*lpr*. La cepa original sin la mutación se denominó MRL/++<sup>120</sup>. La mutación *lpr* está situada en la porción distal del cromosoma 19 entre los genes *Ly44* ("lymphocyte differentiation antigen 44", antígeno de diferenciación de linfocitos 44) y *Tdt* ("terminal deoxynucleotidyl transferase", transferasa deoxinucleótido terminal)<sup>121</sup>.

Los ratones homocigotos MRL/*lpr* desarrollan a edad temprana glomerulonefritis masiva por inmunocomplejos, atrofia tímica, arteritis coronaria, artritis erosiva con factor reumatoide positivo, esplenomegalia masiva e infiltrados mononucleares en glándulas salivares y lacrimales. Lo más característico es la presencia de una linfadenopatía generalizada que comienza aproximadamente a las 8 semanas de edad y que es masiva a las 16-18 semanas. Serológicamente se caracterizan por una hipergammaglobulinemia policlonal, títulos elevados de anticuerpos antinucleares (incluyendo anti-ADN nativo, anti-Smith, anti-histonas, anti-P), hipocomplementemia, crioglobulinas en suero y factor reumatoide. Todas estas manifestaciones convierten a esta cepa murina en un modelo ideal para el estudio de la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren y sobre todo el LES. Esta cepa tiene una tasa de mortalidad del 50% a los 5 meses de edad debido al

fallo de la función renal <sup>122, 123</sup>.

En contraste, los ratones MRL/++ presentan manifestaciones autoinmunes más tardías y leves sin linfadenopatía masiva y una supervivencia más prolongada (50% de mortalidad a los 18 meses de edad).

En el año 1984, Roths et al <sup>124</sup> publicaron la aparición de una nueva mutación espontánea en la cepa murina endogámica C3H/HeJ a la que llamaron **gld** (por "generalized lymphoproliferative disease", enfermedad linfoproliferativa generalizada). La mutación gld está situada en la porción distal del cromosoma 1 próxima al gen de antitrombina-3 <sup>125</sup>. Las manifestaciones clínicas consisten en linfadenopatía generalizada, esplenomegalia y neumonitis intersticial. Sin embargo esta cepa raramente desarrolla nefritis, vasculitis, infiltración de glándulas salivares o atrofia tímica. Serológicamente se caracterizan por presentar leucocitosis, hipergammaglobulinemia y anticuerpos antinucleares incluyendo anti-ADN nativo. La supervivencia es superior que en la cepa con la mutación *lpr*, alrededor de un año <sup>122</sup>.

Matsuzawa et al <sup>126</sup> publicaron en 1990 un nuevo alelo de *lpr* que descubrieron tras observar que una parte de la descendencia de la cepa CBA/K1J desarrollaba linfadenopatía masiva. A esta nueva mutación la denominaron ***lpr*<sup>cg</sup>** (por *lpr* complementando gld) debido a que interaccionaba con la mutación gld para inducir

linfadenopatía, esto es, los ratones dobles heterocigotos  $lpr/+$   $gld/+$  eran normales mientras que los ratones  $lpr^{cg}/+$   $gld/+$  presentaban linfoproliferación y manifestaciones autoinmunes de grado leve. Las manifestaciones clínicas consisten en esplenomegalia y linfadenopatía masiva que respeta parcialmente a los ganglios mesentéricos. Sin embargo, no se produce nefritis, vasculitis o neumonitis intersticial. Las manifestaciones serológicas son las mismas que las descritas para las mutaciones  $lpr$  y  $gld$ . La supervivencia es aproximadamente de un 50% al año de edad.

	MRL/ $lpr$	C3H/ $gld$	MRL/ $lpr^{cg}$
Muerte (meses)	6	12	12
Nefritis	4+	1+	0
Vasculitis	3+	0	0
Neumonitis	1+	3+	0
Hiperyglobulinemia	4+	2+	2+
Anti-ADN nativo	4+	2+	2+

**Figura 3.** Manifestaciones clínicas de LES en cepas murinas.

Uno de los hallazgos más característicos de estas tres mutaciones murinas es que presentan una infiltración progresiva en ganglios linfáticos y en menor grado en bazo por linfocitos con un fenotipo inusual  $Thy1.2^+$   $HSA^+$   $CD4^-$   $CD8^-$   $CD3^+$   $TCR\alpha\beta^+$  receptor IL-2-

B220+ CD44+ CD2- CD28+. En ratones adultos con el cuadro autoinmune establecido estos linfocitos pueden llegar a constituir el 90% de la población total linfocitaria. Estos linfocitos son células T anormales que no expresan CD4 o CD8 (células dobles negativas) <sup>122</sup>. Presentan marcadores de células T como Thy1.2 (marcador de timocitos y células T maduras en el ratón), HSA ("heat stable antigen", antígeno estable al calor, marcador de células T inmaduras), o CD69 (antígeno de activación muy temprana) <sup>127</sup>; sin embargo expresan bajos niveles de los receptores CD5, CD3 y TCR y no expresan el receptor de IL-2 o CD2. Pero también expresan marcadores de células B como B220 pero no Ig de superficie <sup>122</sup>. Estas células parecen ser de origen T como lo confirma el hecho de que la timectomía neonatal en los ratones mutantes previene su acumulación. Además estas células dobles negativas responden pobremente a estimulación con mitógenos, antígenos y anticuerpos anti-TCR, con una deficiente proliferación, adquisición del receptor de IL-2 y producción de IL-2. Sin embargo se ha visto que pueden proliferar en cultivo con anticuerpos anti-TCR/ $\alpha\beta$ , PMA y anti-CD28 <sup>128</sup>. Es posible que procedan de células CD4+CD8- o CD4-CD8+ maduras que han perdido la expresión de CD4 o CD8, aunque no se puede excluir que procedan de timocitos dobles positivos que simultáneamente hayan perdido la expresión de CD4 y CD8 <sup>129</sup>. Basándose en el hecho de que el gen de CD8 se desmetila progresivamente a medida que los timocitos maduran y por tanto es un indicador de la expresión previa de CD8, Landolfi et al <sup>130</sup> examinaron el estado de metilación del gen de CD8 en las células CD4-CD8- de los ganglios linfáticos de ratones lpr. Observaron que las células dobles negativas de los

ratones *lpr* presentaban un gen de CD8 desmetilado. Además, encontraron que la subpoblación doble positiva de timo de ratones *lpr* contenía un elevado porcentaje de células atípicas B220+ CD44+ CD2+. Concluyeron que las células CD4-CD8-CD2- de los ganglios linfáticos de ratones *lpr* procedían de células de timo CD4+CD8+CD2+.

Diversos tratamientos han demostrado aminorar la linfoproliferación y reducir el número de células dobles negativas en bazo y ganglios linfáticos de los ratones *lpr* y *gld*. Estos incluyen la timectomía neonatal y el tratamiento crónico con anticuerpos monoclonales específicos para CD4<sup>129</sup> o CD8<sup>131</sup>.

Las mutaciones *lpr* y *gld* han sido transferidas a otras cepas murinas como AKR/J, Balb/c, C3H/HeJ, C57BL/6J, C57BL/10<sup>132, 133</sup>. Todas estas cepas desarrollan linfadenopatía, esplenomegalia y producción de autoanticuerpos pero no artritis o nefritis. Los ratones MRL +/+ también desarrollan manifestaciones autoinmunes más débiles y más tardías, y los ratones MRL *lpr*/+ heterocigotos desarrollan manifestaciones intermedias entre los no mutantes y los homocigotos<sup>134</sup>. Estos hallazgos sugieren que las mutaciones *lpr* y *gld* no inducen la enfermedad autoinmune sino que más bien aceleran la predisposición a desarrollarla.

Watanabe et al<sup>3</sup> encontraron que el gen del FasR murino estaba localizado en el cromosoma 19 en una región próxima a la mutación *lpr*, lo que les llevó a suponer que



la mutación *lpr* podría afectar la expresión del FasR. Encontraron que la expresión del ARNm del FasR es nula o casi ausente en hígado y timo de ratones con la mutación *lpr*. Mediante el análisis de los fragmentos polimórficos de restricción observaron que el ADNc del FasR en ratones *lpr* presenta patrones anormales y por tanto está reordenado<sup>5</sup>. Concluyeron que **la mutación *lpr* codifica para el gen estructural del FasR**. Además encontraron que **los ratones con la mutación *lpr*<sup>cg</sup>** expresan niveles normales del **FasR**, pero debido a que presentan una **mutación puntual** de timidina a adenina en el nucleótido 786 se produce un reemplazamiento de asparragina por isoleucina en la región citoplasmática del FasR que anula la capacidad del FasR para inducir apoptosis<sup>5</sup> (Figuras 4 y 5).

Adachi et al<sup>135</sup>, Chu et al<sup>136</sup> y Wu et al<sup>137</sup> demostraron independientemente que la alteración del FasR en la mutación *lpr* se debía a la inserción del **retrotransposon ETn** ("early transposable element", elemento temprano transponible) en el segundo intrón del gen del FasR. El retrotransposon funciona como un retrovirus endógeno, está constituido por ARN viral con capacidad de insertarse en el ADN genómico de otros organismos tras la retrotranscripción de su ARN y como puede introducirse en distintos puntos del genoma se denomina retrotransposon o elemento móvil en el genoma. Este retrotransposon ETn origina una terminación prematura en la transcripción del ARNm del FasR antes del tercer exón y en consecuencia se reduce la expresión de la proteína. Adachi et al<sup>135</sup> además sugieren que la inserción de ETn no abole completamente la

expresión del FasR y que una pequeña proporción puede ser transcrita a través del ETn. Kobayashi et al <sup>138</sup> demostraron la presencia de ARNm completo del FasR, aunque a bajos niveles, en timo e hígado de ratones *lpr*, lo que indica que existe "filtración" del FasR.

La alteración del FasR produce defectos en la tolerancia de las células T y B lo que origina el síndrome autoinmune linfoproliferativo <sup>139</sup>. Wu et al <sup>140</sup> crearon ratones MRL/*lpr* transgénicos inyectando en los embriones ADNc completo del FasR murino bajo la regulación del promotor específico de células T CD2. Consiguieron expresión del FasR en los linfocitos T de los ratones transgénicos pero no en los linfocitos B. La restauración del FasR en las células T produjo una corrección de las manifestaciones autoinmunes: eliminó la glomerulonefritis, la linfadenopatía masiva y las células T CD4- CD8- B220+, se normalizaron los niveles de inmunoglobulinas y desaparecieron los autoanticuerpos del isotipo IgG2a y disminuyeron aunque sin desaparecer los IgG1. Esto demuestra que la corrección temprana del FasR en las células T es suficiente para eliminar la enfermedad autoinmune acelerada incluso en presencia de células B con defectos en el FasR. Estos hallazgos son concordantes con los encontrados por Sobel et al <sup>141</sup> que demostraron "in vivo" que las células T de ratones *lpr* eran esenciales para la producción de autoanticuerpos. Sin embargo, Sobel et al <sup>142</sup> también demostraron que las células B de los ratones *lpr* presentaban un defecto intrínseco por lo que producían autoanticuerpos y no eran recipientes pasivos de señales transmitidas por células T

anómalas. El papel de las células B fue corroborado por Shlomchik et al <sup>143</sup> creando mediante cruzamiento ratones homocigotos para las mutaciones *lpr* y "*Jh knockout*", los cuales carecen de células B desde el nacimiento. Los ratones sin células B no desarrollaron glomerulonefritis ni vasculitis ni nefritis intersticial pero sí presentaron linfadenopatía y esplenomegalia aunque de menor magnitud que los ratones con células B.

Takahashi et al <sup>6</sup> encontraron que el gen del FasL murino estaba situado en la región distal del cromosoma 1 en la misma localización donde había sido descrita la mutación *gld*. No encontraron reordenamiento en el gen del FasL ni tampoco que la expresión del ARNm del FasL estuviera disminuída en ratones *gld*. Sin embargo, demostraron que **el ADNc del FasL en ratones *gld*** presentaba un cambio de timidina a citosina lo que originaba un reemplazamiento de leucina por fenilalanina en el aminoácido 273 que corresponde a la región extracitoplasmática del FasL. Esta **mutación puntual** da lugar a unos niveles de expresión del FasL normales pero con una capacidad para inducir apoptosis abolida <sup>6</sup>. Esto explicaría por qué la transferencia de células de médula ósea de ratones ++ a ratones *gld* produce una corrección de las manifestaciones autoinmunes al suplir el defecto del FasL <sup>144</sup> (Figuras 4 y 5).

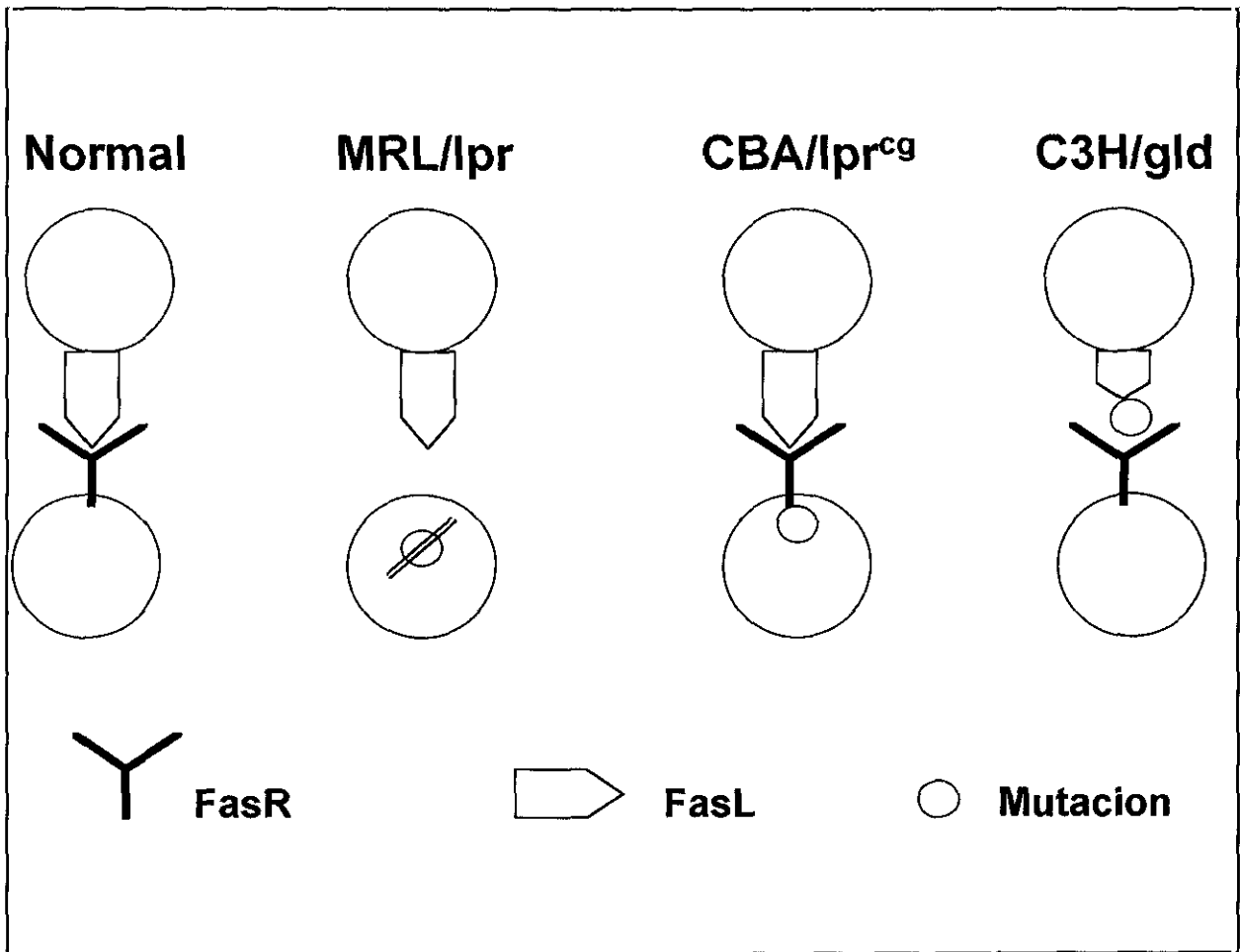


Figura 4. Expresión del Fas en modelos murinos de LES.



## • 5. MUERTE LINFOCITARIA MEDIADA POR FAS

Se ha estimado que la médula ósea produce aproximadamente  $10^7$  precursores linfoides al día. Debe existir un mecanismo de control de muerte celular que elimine las células que no son reclutadas en una respuesta inmune y que evite la acumulación de estas células con el consiguiente riesgo de desarrollar un linfoma o una enfermedad autoinmune <sup>145</sup>. Estos mecanismos de control no suceden aleatoriamente sino en estadios específicos de la maduración linfoide.

El desarrollo de las **células T** comienza por la migración de sus precursores al timo desde donde salen posteriormente como células maduras a la periferia. Durante el proceso de maduración, las células que expresan un TCR que interacciona con el CMH expresado en el epitelio tímico son seleccionadas positivamente y las que no, mueren por apoptosis. Además las células que interaccionan con autoantígenos presentados en el contexto del CMH son seleccionadas negativamente y también mueren por apoptosis. El resultado es que sólo un 5% de los precursores T que emigran al timo salen a la periferia <sup>19</sup>. En la periferia, también existe un mecanismo de selección de forma que las células T que reconocen autoantígenos primero son activadas y posteriormente mueren por apoptosis <sup>146</sup>.

Las **células B** sufren un proceso de selección en los centros germinales de los ganglios linfáticos antes de convertirse en células plasmáticas o en células B memoria <sup>147</sup>. Tras encontrar a un antígeno presentado por las células foliculares dendríticas, las células B nativas migran a los folículos primarios, proliferan hasta formar los centros germinales y sufren mutaciones somáticas en los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. Las células B que expresan receptores de alta afinidad son seleccionadas y aquellas que presentan receptores de baja afinidad mueren por apoptosis. En este proceso de mutación también se pueden crear células B reactivas contra antígenos propios que mueren por apoptosis <sup>148</sup>.

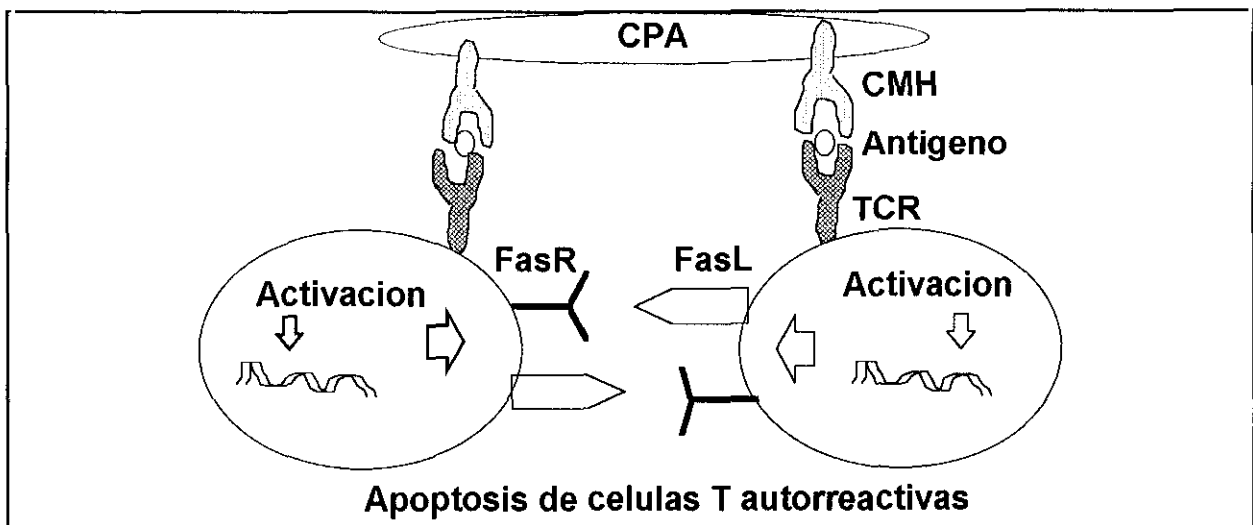
Inicialmente, algunos autores como Matsumoto et al <sup>149</sup> o Zhou et al <sup>150</sup> sugirieron que en los ratones *lpr* existía un defecto en la **selección** negativa de las células T autorreactivas **en el timo**. Singer et al <sup>151</sup> habían comprobado previamente que los ratones *lpr* y *gld* deleccionaban normalmente en el timo los linfocitos que expresaban un TCR V $\beta$  autorreactivo. Estudios posteriores lo han confirmado. Sidman et al <sup>152</sup> encontraron que los mecanismos de selección negativa y positiva en ratones homocigotos *lpr* y *gld* transgénicos para el TCR eran normales. Herron et al <sup>153</sup> sugirieron que las células dobles negativas de ratones *lpr* eran seleccionadas positivamente en el contexto del CMH de clase II como sucede con las células CD8+ y posteriormente se expanden anormalmente en la periferia.

Otros autores han demostrado que los **mecanismos de tolerancia periférica** son anormales en ratones lpr. Russell et al <sup>23, 24</sup> habían demostrado que las células T maduras en reposo eran resistentes a la inducción de muerte celular tras activación por unión al TCR, pero las células T CD4+ y CD8+ activadas eran sensibles. También encontraron que las células T maduras CD4+ o CD8+ activadas de los ratones lpr, aunque mostraban una proliferación y una producción de citoquinas similar a los ratones no mutantes, presentaban un defecto en la inducción de muerte celular tras estimulación "in vitro" con enterotoxina estafilocócica A o anticuerpos anti-CD3 en presencia de células presentadoras de antígeno <sup>154</sup>. Scott et al <sup>155</sup> demostraron que tras administración "in vivo" del superantígeno enterotoxina B estafilocócica, los ratones lpr presentaban alteraciones en la delección periférica y anergia de células T a diferencia de otras cepas murinas que desarrollan LES o cepas normales. Wang et al <sup>156</sup> demostraron que la apoptosis inducida por anticuerpos anti-CD4 en células T de ratones normales no se producía en células T de ratones con la mutación lpr los cuales no expresan el FasR, lo que implica al FasR en esta forma de apoptosis.

Todos estos hallazgos sugieren una **función de la vía Fas en los mecanismos de tolerancia periférica**. Elkon <sup>157</sup>, Nagata y Suda <sup>158</sup> y Vignaux y Golstein <sup>159</sup> han propuesto la siguiente hipótesis (Figura 6). Las células presentadoras de antígeno presentarían el péptido autorreactivo en el contexto del CMH al TCR de los linfocitos autorreactivos. Estos linfocitos T inicialmente estarían en reposo y expresarían poco el



FasR y poco o nada el FasL. Al reconocer al antígeno, el linfocito se activaría y se induciría la expresión del FasR y el FasL. Varios días después de la activación, el FasR sería funcional y la célula moriría por apoptosis. La muerte sería bien por suicidio (la misma célula expresa el FasR y el FasL) o por fratricidio (una población celular expresa el receptor y la otra el ligando). En ratones con las mutaciones *lpr* o *gld*, debido a que son deficientes bien en el FasR o en el FasL, estas células T autorreactivas no morirían sino que se acumularían y colaborarían con células B autorreactivas que producirían autoanticuerpos <sup>160</sup>. Sin embargo, otros mecanismos también deben contribuir a la eliminación de linfocitos activados, y estos otros mecanismos pueden predominar en ratones jóvenes, mientras que aquellos mediados por el Fas podrían ser esenciales en ratones adultos <sup>114</sup>.



**Figura 6.** Modelo de delección clonal periférica mediada por Fas.

CPA: célula presentadora de antígeno.

El Fas también es trascendente en los **mecanismos de citotoxicidad mediada por células T**. Esta actividad citolítica puede ser realizada por linfocitos CD4, CD8 y linfocitos "natural killer". Desde el punto de vista molecular existen dos mecanismos complementarios de inducción de citotoxicidad mediada por células T cuyo resultado es la apoptosis de la célula diana. Uno es mediado por una proteína dependiente de calcio conocida como perforina o proteína formadora de poro <sup>161</sup>. La perforina es liberada por exocitosis por gránulos citoplasmáticos, se une e inserta en la membrana de la célula diana y forma un canal a través del cual circulan otros contenidos de los gránulos como serin-esterasas, FNT, granzima A y B <sup>162</sup> o iones como el calcio <sup>163</sup>. Este mecanismo es funcionalmente similar al desencadenado por el complemento C9. El otro mecanismo está mediado por la interacción entre el FasL en la célula efectora y el FasR en la célula diana y es independiente de calcio. Entre las células T CD4, las Th1 ("T helper 1", son células T cooperadoras de la inmunidad celular) pueden expresar el FasL y lisar por la vía del Fas con mayor eficacia que las Th2 ("T helper 2", células T cooperadoras de la producción de anticuerpos). Las células CD4 no inducen lisis a través del sistema de la perforina. Las células CD8, que son los linfocitos citotóxicos profesionales, pueden lisar a través de ambas vías, la del Fas y la de la perforina <sup>158</sup>. Se ha demostrado la expresión del FasL en esplenocitos activados <sup>113, 159</sup> y en líneas celulares T citotóxicas CD8+ <sup>112</sup> y CD4+ <sup>28</sup>. Kagi et al <sup>164</sup> observaron que, aunque en ratones deficientes para el gen que codifica la perforina existía un deterioro de la actividad citotóxica, ésta no era completamente abolida. Posteriormente, Kagi et al <sup>165</sup> y Lowin et al <sup>166</sup> demostraron que

la actividad citotóxica residual era mediada por el Fas. Además, las células y los ratones deficientes en perforina eran incapaces de producir lisis de células deficientes en el FasR como los timocitos de ratones lpr. Hanabuchi et al <sup>167</sup> demostraron que una línea celular T CD4+ citotóxica murina estimulada con anticuerpos anti-CD3 expresaba el FasL en su superficie y era capaz de lisar células que expresaban el FasR por una vía específicamente mediada por Fas. Los linfocitos T citotóxicos pueden ejercer su actividad citotóxica a través de las vías del Fas o de la perforina eficientemente en células diana sin núcleo <sup>168</sup>. Además de los linfocitos T activados, los linfocitos "natural killer" también expresan basalmente el FasL presentando actividad citotóxica mediada por Fas frente a células diana que expresan el FasR <sup>169</sup>.

El **Fas** también está implicado en la **muerte celular fuera del sistema linfoide**. Ogasawara et al <sup>170</sup> crearon un anticuerpo monoclonal hamster anti-ratón anti-FasR (Jo-2) con actividad citolítica contra células que expresaban el FasR. La administración intraperitoneal de este anticuerpo produjo la muerte en 6 horas de ratones normales o no mutantes pero no de ratones lpr o lpr<sup>og</sup>. La observación de una elevación de las enzimas de necrosis hepática y mediante estudios histológicos, concluyeron que el responsable de la muerte era un fallo hepático fulminante, aunque no excluyeron la posibilidad de daño letal en corazón o pulmón <sup>170</sup>.

## • 6. LES HUMANO Y APOPTOSIS

Los ratones con las mutaciones *lpr* y *gld* presentan manifestaciones autoinmunes que mimetizan el LES humano, aunque en éste no es típica la presencia de linfadenopatía masiva ni la acumulación de células dobles negativas. Shivakumar et al <sup>171</sup> observaron en individuos con LES activo la existencia una población de células T CD4- CD8- TCR/ $\alpha\beta$ +, distintas de las CD4- CD8- TCR/ $\gamma\delta$ , implicadas en la génesis de anticuerpos anti-ADN asociados a nefritis lúpica. Sneller et al <sup>172</sup> describieron dos pacientes con hipergammaglobulinemia, linfocitosis, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y una elevada proporción de células dobles negativas, todo ello de características similares al cuadro que desarrollan los ratones mutantes. Posteriormente Fisher et al <sup>173</sup> describieron el síndrome linfoproliferativo autoinmune en cinco niños pertenecientes a familias distintas, uno de los cuales había sido incluido en el trabajo de Sneller et al <sup>172</sup>, y que desarrollaron el mismo cuadro clínico ya descrito por estos autores. Demostraron que en este síndrome los linfocitos T, tanto CD4 como CD8, mostraban una capacidad de apoptosis defectuosa asociada a distintas mutaciones heterocigotas del gen del FasR. Rieux-Laucat et al <sup>174</sup> también estudiaron tres pacientes con hepatoesplenomegalia y linfadenopatía y una gran proporción de células TCR positivas y dobles negativas. Uno de estos tres pacientes presentaba una expresión reducida del FasR y los tres presentaban defectos de apoptosis mediada por el Fas "in

vitro". Mediante análisis del cDNA del FasR en estos pacientes, demostraron que todos ellos presentaban deleciones en la secuencia de nucleótidos del dominio citoplasmático del FasR que anulaban la capacidad para inducir apoptosis del receptor. Estos hallazgos sugieren una participación del Fas en la tolerancia inmunológica en humanos y podrían aportar bases genéticas para explicar la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes.

Los pacientes con LES presentan **linfocitos B circulantes activados** que producen grandes cantidades de inmunoglobulinas y autoanticuerpos. Esta situación hiperproliferativa ha sido implicada en la patogenia del LES. Se ha descrito una elevada actividad transcripcional de oncogenes como c-myc y c-myb en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con LES <sup>175</sup>. La activación policlonal B que se ha demostrado en el LES puede ser explicada a través de distintas hipótesis <sup>176</sup>. 1) Por un aumento de la actividad T colaboradora de la cual serían responsables los linfocitos T colaboradores o incluso los T supresores <sup>177</sup>. 2) Por defecto de la actividad T supresora, en este sentido cabe destacar que se ha observado una respuesta deficiente a concanavalina A <sup>178</sup> y al virus de Epstein-Barr <sup>179</sup>, ambos inductores de respuesta T supresora. 3) Por último, por un defecto intrínseco de los linfocitos como sucedería si fallaran los mecanismos de apoptosis.

Los hallazgos en ratones lpr han estimulado la investigación en el LES humano.

Emlen et al <sup>180</sup> encontraron que las células mononucleares de sangre periférica en pacientes con LES presentaban una tasa de apoptosis "in vitro" más acelerada que las células de pacientes con artritis reumatoide o de sujetos sanos utilizados como control, hallazgo similar al descrito en las células dobles negativas de ratones lpr <sup>181</sup>. Esta apoptosis acelerada no mostraba relación con tratamiento con corticoides o con fármacos citotóxicos. Además, estos autores demostraron que los linfocitos de pacientes con LES liberaban una mayor concentración de nucleosomas en el sobrenadante, que era proporcional a la tasa de apoptosis. El resultado prodría ser gran liberación de antígenos nucleares que en último término desencadenaría una respuesta autoinmune con formación de inmunocomplejos.

En el LES se producen autoanticuerpos contra gran variedad de **autoantígenos** de localización celular diversa, entre ellos destacan ADN nativo de doble cadena e histonas. La estructura formada por un núcleo de ocho moléculas de histonas rodeado de 160 pares de base de ADN forma un nucleosoma. La presencia de inmunocomplejos que contienen ADN nativo durante las fases de actividad del LES, sugiere que probablemente los nucleosomas endógenos son uno de los antígenos contra los que se dirige la respuesta inmune <sup>182</sup>. Una fuente potencial de antígenos es la abundante formación de nucleosomas procedentes de células que sufren apoptosis, ya que en esta forma de muerte celular existe una división internucleosomal del ADN. En este sentido, Rumore y Steinman <sup>183</sup> demostraron que el ADN en pacientes con LES no

existía en forma de moléculas de ADN fragmentadas aleatoriamente sino en estructuras similares a los oligonucleosomas. Amoura et al <sup>184</sup> encontraron que en ratones MRL/lpr y MRI/++ los anticuerpos antinucleosomas se detectaban antes que los anticuerpos anti-ADN nativo o anti-histonas, lo que condicionaba una respuesta más temprana en los ratones lpr. Estos últimos autores consiguieron también obtener por elución anticuerpos anti-nucleosomas de riñones en ratones lpr con proteinuria. Es posible, como propone Savill <sup>185</sup>, que un fallo en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos pudiera ser el responsable de la presencia de nucleosomas circulantes en el LES e incluso que este fallo perpetuara la inflamación articular en la artritis reumatoide.

Por otra parte, es conocido que la **exposición a la luz UV** en pacientes con LES induce la aparición de lesiones en la piel y puede provocar una exacerbación sistémica de la enfermedad por mecanismos no esclarecidos. Golan et al <sup>186</sup> observaron que los queratinocitos de pacientes con LES, al compararlos con los de sujetos sanos, presentaban un aumento en la expresión de antígenos solubles intracelulares en la membrana celular tras irradiación UV B "in vitro". Posteriormente, Casciola-Rosen et al <sup>187</sup> demostraron que la irradiación UV B era capaz de inducir apoptosis en cultivos de queratinocitos, existiendo además una redistribución de los autoantígenos del LES en dos tipos de vesículas localizadas en la superficie de las células apoptóticas. Las vesículas más pequeñas contenían ribosomas, riboproteínas SS-A/Ro y fragmentos de retículo endoplásmico y las más grandes contenían nucleosomas. Dado que la infección

por el virus Sindbis induce apoptosis, Rosen et al <sup>188</sup> examinaron la distribución de los componentes virales en las vesículas apoptóticas, encontrando que en las vesículas de menor tamaño co-existían autoantígenos con antígenos virales y viriones. Estos estudios despiertan interés en los fragmentos apoptóticos como posibles inmunógenos en la patogenia del LES.

Otros autores han analizado la **expresión del Bcl-2 en el LES** describiendo resultados contradictorios. Kumagai et al <sup>189</sup> describieron una expresión disminuída del Bcl-2 en células T y aumentada en células B de pacientes con LES. Graninger et al <sup>190</sup>, sin embargo encontraron una elevada expresión del Bcl-2 en los linfocitos T tanto en pacientes con LES como en pacientes con septicemia y con leucemia linfocítica crónica. Posteriormente, Aringer et al <sup>191</sup> demostraron que las células T pero no las células B de pacientes con LES presentaban niveles elevados del Bcl-2. Estos autores postularon que un aumento en los niveles del Bcl-2 podría representar un intento de equilibrar la alta tasa de apoptosis que muestran los linfocitos en el LES. En contraposición a estos hallazgos, Rose et al <sup>192</sup> no encontraron diferencias en la expresión de la proteína Bcl-2 en pacientes con LES al compararlos con controles sanos y con pacientes con otras enfermedades autoinmunes.

La apoptosis está determinada por el balance entre las señales inductoras e inhibitoras de muerte que recibe una célula. Tanto el FasR como el Bcl-2 se expresan



en linfocitos, por lo que debe existir una interacción entre ambos que determine finalmente el destino de la célula. Itoh et al <sup>193</sup> transfectaron una línea celular linfoma T y otra línea leucémica mieloide murinas con el FasR y el Bcl-2 humanos para analizar dicha interacción. La hiperexpresión del Bcl-2 produjo una inhibición parcial de la muerte celular inducida por un anticuerpo anti-FasR y por el FNT, lo que sugiere que el Bcl-2 interfiere en la transmisión de apoptosis mediada por el FasR y el FNT. La apoptosis fue inhibida completamente por la coexpresión de los genes Bcl-2 y BAG-1 <sup>67</sup>.

## **IV. APORTACION PERSONAL**

## **IV. 1 MATERIAL Y METODOS**

## 1. 1 ESTUDIOS EN RATONES

### 1. 1. 1 RATONES

Los ratones Balb/c (Balb/c/cJ), MRL/lpr (MRL/Mpj-lpr/lpr), MRL/++ (MRL/Mp-+/+), C3H (C3H/HeSnJ), C3H/gld (C3H/gld/gld), CBA/++ (CBA/K1Jms), CBA/lpr<sup>cg</sup> (CBA/K1Jms/lpr<sup>cg</sup>/lpr<sup>cg</sup>) fueron obtenidos originalmente de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME) y posteriormente criados en el Hospital for Special Surgery (Nueva York, EEUU).

### 1. 1. 2 PREPARACION DE SUSPENSIONES CELULARES

Se realizaron en condiciones estériles en una campana de flujo laminar (SterilGard Hood. Class II. Type A/B3, The Baxter Company, Inc. modelo 56-600, Sanford ME). Los timos, bazo y ganglios linfáticos fueron extraídos y macerados asépticamente con tapones de goma esterilizados en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (JRH Biosciences #56-509-001, Lenexa KS) en placas de cultivo de 60x15 mm (Falcon Labware #3002, Becton Dickinson, Lincoln Park NJ). Las suspensiones celulares fueron lavadas tres veces en medio RPMI 1640 en tubos de 15 ml (Falcon #2009) mediante centrifugación (Beckman Instruments, modelo TJ-6, Palo Alto CA) a 1200 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente (TA). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer (Improved Neubauer 0.1 mm deep

Hematocytometer, American Optical Corporation, Buffalo NY) en un microscopio Laborlux (Kleitz Wetzlar, Alemania). A continuación fueron resuspendidas en medio de cultivo en cantidades adecuadas. Para el bazo, los hematíes fueron lisados mediante incubación durante 5 minutos en hielo en 0.17 M (molar) cloruro de amonio (Fisher Scientific #A661, Fair Lawn NJ) y 20 mM (milimolar) Tris (Trizma base, Sigma #T-1503) diluidos en agua destilada pH 7.6.

### 1. 1. 3 CULTIVO CELULAR Y ACTIVACION "IN VITRO"

Se cultivaron las suspensiones celulares de bazo y ganglios linfáticos a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon #3047). Como medio de cultivo se utilizó RPMI 1640 suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 2 mM L-glutamina, antibióticos (Penicilina 100 U/ml, Streptomina 100 µg/ml y Fungizona 0.25 µg/ml) ( todos los anteriores de JRH Biosciences #12-10378P, #59202-77P y #59606-77P respectivamente, Lenexa KS) y 50 µM 2-mercaptoetanol (Sigma #M-6250, St Louis, MO). El cultivo se realizó en una incubadora con atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C (Water Jacketed Incubator, Forma Scientific, Inc., modelo 3326 S/N 32186-3675, Marieta, OH).

Los mitógenos utilizados para estudiar la inducción de la expresión del FasR en bazo y ganglios linfáticos fueron:

-para células T: Concanavalina A (Sigma #C2010) 2 µg/ml, anti-CD3 (hibridoma 145-

2C11) dilución 1:5000 de líquido ascítico, IL-2 humana recombinante (Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ) 10 U/ml.

-para células B: Lipopolisacárido (LPS) *W.S. typhosa* 0901 (DIFCO Laboratories # 3124-25-6, Detroit, MI) 10 µg/ml e IgM cabra anti-ratón cadena µ específico (Jackson Immunoresearch #115-005-020, West Grove, PA) 10 µg/ml.

Para inducir la expresión del ligando del Fas, las células T de bazo fueron incubadas con concanavalina A e IL-2 durante 2 días al cabo de los cuales volvieron a ser estimuladas con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) 10 ng/ml e ionomicina 500 ng/ml durante 4 horas (Los dos últimos de Sigma Chemical Co. # P-8139 y I-0634 respectivamente, St. Louis, MO) <sup>6</sup>.

La viabilidad de las células tras el cultivo fue superior al 80% determinada mediante exclusión por tripán azul (Trypan blue 0.4% solution in saline, JKH Biosciences # 59-41077P, Lenexa, KS).

#### 1. 1. 4 AISLAMIENTO DE LAS POBLACIONES DE GANGLIOS LINFATICOS

Se obtuvieron ganglios linfáticos aumentados de tamaño de ratones MRL/lpr de 4-5 meses de edad para analizar la expresión del ligando del Fas en las distintas subpoblaciones.

Los linfocitos dobles negativos se obtuvieron cultivando la suspensión celular total con anticuerpos anti-CD4 (clon GK1.5) y anti-CD8 (clon 3.168) durante 45 minutos a 4°C en rotación continua (Fisher, modelo 346, #14-059-346). Se añadió anti-CD4 como sobrenadante de cultivo a una dilución de 1 ml/10<sup>7</sup> células y anti-CD8 como líquido ascítico a una dilución final de 1/100. Sin lavar, se siguió de incubación con complemento de cobaya (Low-Tox-M guinea pig complement, Cederlane Laboratories #CL4051, Hornby, Ontario) diluido 1/10 en RPMI con 3% ASB (albúmina sérica bovina, pH 7.0, pureza 98%, ICN Biochemicals # 160069, Cleveland, Ohio), 20 mM bufer Hepes (Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanesulfónico, JRH Biosciences #59-20577P) y 30 µg/ml de ADNsa ("DNase I RNase free from bovine pancreas", Boehringer Mannheim #776785) durante 1 hora a 37°C. A continuación se examinó la viabilidad mediante tripán azul y se lavaron las células. Se eliminaron las células muertas y las células residuales no lisadas tras complemento mediante bolas magnéticas (Dynabeads M-450 #110.08, Dynal, Oslo, Noruega) cubiertas con IgG oveja anti-rata en una proporción 8 (bolas) / 1 (células vivas residuales) durante 1 hora a 4°C.

Las células positivas para CD4 o CD8 se obtuvieron depleccionando las células dobles negativas y B mediante incubación de la población total con anti-B220 (clon 14.8) añadido como líquido ascítico a una dilución final 1/100 durante una hora a 4°C en rotación continua. Las células fueron lavadas y resuspendidas en RPMI sin bicarbonato sódico con 10% suero de ternera fetal y 20 mM Hepes. Las células cubiertas con anti-

B220 fueron eliminadas mediante adherencia en placas de cultivo de 100x20 mm de poliestireno (Falcon #3003) precubiertas con IgG (H+L) cabra anti-rata (Jackson #112-005-003) en tres ocasiones a 4°C, 30 minutos cada una. Las placas de cultivo para adherencia fueron tratadas cubriéndolas durante una noche a 4°C con el anticuerpo diluído a 100 µg/ml en BSF (buffer salino fosfato) seguido de 5 lavados con BSF (BSF pH 7.4, composición para 1 litro: 8 g NaCl, Sigma #S-9625; 0.2 g KCl, Sigma #P-4504; 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Mallinckrodt Chemical Works #7917, NY; 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Fisher #P285). Se recogieron las células no adherentes y las células residuales cubiertas con el anticuerpo fueron eliminadas mediante bolas magnéticas como se describió anteriormente.

La pureza de la población fue examinada mediante citometría de flujo con los siguientes anticuerpos: RA3-3A1/6.1, GK1.5 PE (ficoeritrina) conjugado, IgM F(ab')<sub>2</sub> cabra anti-ratón cadena µ específico FITC (isotiocianato de fluoresceína) conjugado (Jackson #115-096-075) y 53-6.72. Para ambas poblaciones se consiguió una pureza superior al 95%.

#### 1. 1. 5 LINEAS CELULARES

Una línea celular T TSST-1 reactiva (>99% CD4+) aislada de células T de bazo de ratones MRL/++ fue donada por el Dr. S. Friedman y J. Tumang del Hospital for Special Surgery.



Las líneas celulares B A20, 1881 y 2PK3 fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD. A20 (TIB 208) es una línea celular B madura derivada de linfoma de ratones Balb/c, que expresa IgG de superficie, pero no expresa IgM o IgA<sup>194, 195</sup>. 1881 es una línea celular pre-B derivada de médula ósea de ratones Balb/c transformada con el retrovirus A-MuLV ("Abelson murine leukemia virus", virus Abelson de la leucemia murina). 1881 presenta cadenas  $\mu$  reordenadas en su citoplasma pero no secreta ni expresa en superficie cadenas  $\mu$  o ligeras<sup>196, 197</sup>. 2PK3 es una línea celular B madura derivada de linfoma de ratones Balb/c que expresa IgG de superficie<sup>198</sup>.

#### 1. 1. 6 ANTICUERPOS

Anti-FasR, IgG fragmento F(ab)<sub>2</sub> conejo anti-ratón, es un anticuerpo policlonal monoespecífico producido en el laboratorio del Hospital for Special Surgery<sup>199</sup> a partir de suero obtenido de conejos inmunizados con un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 5-23 de la secuencia de la proteína FasR murina.

Jo-2<sup>170</sup> (anticuerpo monoclonal anti-FasR, IgG hamster anti-ratón), CD54 (ICAM-1, "intercelular adhesion molecule", molécula de adhesión intercelular; IgG hamster anti-ratón) y CD69 FITC-conjugado (antígeno de activación muy temprana, IgG hamster anti-ratón) fueron suministrados por Pharmigen (San Diego, CA) #15400D, 1541D y 01504D respectivamente.

Se obtuvieron de ATCC los hibridomas específicos para los siguientes marcadores de superficie celular:

- Thy1.2, HO-13-4 (TIB 99), IgM ratón anti-ratón.
- CD4, GK 1.5 (TIB 207), IgG rata anti-ratón.
- CD8, 116-13.1 (HB 129), IgG ratón anti-ratón.
- CD8, 53-6.72 (TIB 105), IgG rata anti-ratón.
- CD8, 3.168, IgM rata anti-ratón.
- B220, RA3-3A1/6.1 (TIB 146), IgM rata anti-ratón.
- B220, 14.8 (TIB 164), IgG rata anti-ratón.
- CD3, 145-2C11, IgG hamster anti-ratón.
- HSA, J11d.2 (TIB 183), IgM rata anti-ratón.
- Fc-γII receptor, 2.4G2 (HB 197), IgG rata anti-ratón.
- IL-2 receptor, 7D4 (CRL 1698), IgM rata anti-ratón.
- I-A<sup>d</sup>, BP107.2.2 (TIB 154), IgG ratón anti-ratón.
- I-A<sup>k</sup>, 10-2.16 (TIB 93), IgG ratón anti-ratón.

Todos ellos fueron cultivados en el laboratorio del Hospital for Special Surgery en las condiciones recomendadas por los creadores. Tras centrifugación de las células, se utilizaron los sobrenadantes sin diluir.

Los siguientes anticuerpos secundarios fueron suministrados por Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA.:

- IgM F(ab')<sub>2</sub> cabra anti-ratón cadena  $\mu$  específico FITC conjugado #115-096-075.
- IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub> cabra anti-ratón FITC conjugado #115-096-062.
- IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub> burro anti-conejo PE conjugado #711-106-152.
- IgG F(ab')<sub>2</sub> oveja anti-ratón fragmento Fc (fracción constante) específico FITC conjugado #515-096-071.
- IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub> cabra anti-hamster FITC conjugado #107-095-142.
- IgG F(ab')<sub>2</sub> ratón anti-rata fragmento Fc específico FITC conjugado #212-096-103.
- IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub> burro anti-rata FITC conjugado #712-096-153.
- Streptavidina conjugada a FITC #016-090-084.

Como control se utilizaron BSF o los siguientes anticuerpos:

- IgG F(ab')<sub>2</sub> de conejo no inmunizado (Miles Laboratories Inc. #82-455-1, Naperville IL).
- Gamma globulina de ratón (Jackson #015-000-002).
- Gamma globulina de hamster (Jackson #007-000-002).
- Gamma globulina de rata (Miles Laboratories Inc. #82-504, Kankakee IL).

## 1. 1. 7 ANALISIS DE CITOMETRIA DE FLUJO

Las tinciones se realizaron en placas de cultivo de 96 pocillos (Falcon #3077). Para tinción de un solo color se incubaron  $2 \times 10^5$  células. Para tinción de dos colores, se

incubaron  $4 \times 10^5$  células en diferentes pasos con anticuerpos secundarios FITC o PE conjugados. Cada anticuerpo se incubó durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  en un volumen final de 10-20  $\mu\text{l}$ , seguido de tres lavados con 1% ASB / 0.1% azida sódica (Fisher #S227-500, Fair Lawn, NJ) / BSF centrifugando a 1200 rpm durante 3 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Cuando se consideró apropiado, se realizó bloqueo con suero normal del animal con el que había sido inmunizado el segundo anticuerpo: conejo (Pel-Freez #31119-5, Rogers ARK) o cabra (Pel-Freez #32119). Las células B y macrófagos de bazo y ganglios linfáticos fueron prebloqueados con anti-FcR $\gamma$ II (hibridoma 2.4G2) para evitar tinción inespecífica.

Las muestras fueron analizadas en un citofluorógrafo IIs50H (Ortho Diagnostic Systems Inc., Westwood, MA). Para cuantificar la expresión del anticuerpo en estudio, se analizaron al menos 5000 células por cada muestra usando el histograma obtenido con el anticuerpo control isotipo para definir el valor negativo. Las células muertas y los detritus fueron excluidos mediante selección basada en dispersión en ángulo anterior y derecho. Los datos fueron mostrados en una escala logarítmica de intensidad creciente de fluorescencia verde o roja.

#### 1. 1. 8 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

Se usaron como efectoras células no fraccionadas de ganglios linfáticos de ratones MRL/lpr<sup>cg</sup> y C3H/gld de 4 meses de edad y como dianas las líneas celulares B A20 y 1881. Estas líneas celulares B fueron utilizadas porque previamente habíamos

descrito en el laboratorio del Hospital for Special Surgery que la expresión del FasR era muy baja o ausente (menor al 2%) en líneas celulares pro- y pre- B (como 1881), se expresaba en líneas tempranas B y su expresión era muy alta (superior al 90%) en la línea madura de linfoma B A20 <sup>200</sup>.

1x10<sup>6</sup> células diana resuspendidas en medio DMEM (Dulbeccos Minimum Essential Medium, JRH Biosciences #56-499-001) suplementado (suero de ternera fetal, L-glutamina, antibióticos y 2-mercaptoetanol en las concentraciones ya descritas) fueron marcadas con cromo 51 (NEN Products #NEZ-030, Dupont de Nemours and Co., Boston, MA) durante 2 horas a 37°C y 10% CO<sub>2</sub>. Se incubaron células de ganglios linfáticos recién aisladas con 1x10<sup>4</sup> células diana marcadas con cromo 51 en una proporción efector : diana de 80, 40, 20 y 10:1 en triplicado en microplacas de 96 pocillos (Falcon) a 37°C. Tras 4-6 horas de cultivo, las células fueron centrifugadas (1200 rpm durante 5 minutos), se recogió el sobrenadante y se contó la radioactividad en una  $\gamma$ -cámara (Packard Instruments Co., Downers Grove IL). La liberación de cromo 51 fue calculada mediante la fórmula:  $100 \times (\text{liberación muestra} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$ .

#### 1. 1. 9 EXTRACCION DE ARN

El ARN total fue extraído mediante el método de fenol-ácido guanídico <sup>201</sup>. Las células fueron previamente lavadas con BSF frío estéril centrifugando (Eppendorf, modelo

5415, Hamburgo, Alemania) a 6000 rpm durante 5 minutos a 4°C en tubos de 1.5 ml (Sarstedt #72.690.051, Nümbrecht, Alemania). Para órganos linfoides, se añadió al pellet 1 ml de RNA-STAT-60 (Tel-Test "B" Inc. #CS-110, Friendswood, TX) por cada  $10 \times 10^6$  células, se pipeteó la mezcla vigorosamente y se agitó en vortex (Fisher Vortex Genie 2 #12-812) durante 1 minuto. Para órganos parenquimatosos, se utilizó 1 ml de RNA-STAT-60 para homogeneizar cada 100 mg de tejido. Los órganos fueron previamente cortados en piezas menores de 0.5 cm<sup>2</sup> y sometidos a la acción de ultrasonidos (Sonifier Cell Disruptor, modelo W185, Heal Systems-Ultrasonics Inc., Plainview, NY) en hielo 3 veces 15 segundos cada una para evitar que la temperatura del tejido fuera demasiado elevada. El ARN fue extraído con 0.2 volumen de cloroformo (Fisher #C574-1, Fair Lawn, NJ) / alcohol isoamílico (Fisher #A393-500) en una proporción 24/1, se agitó en vortex y se colocó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se recogió cuidadosamente la fase superior acuosa que contenía el ARN y fue precipitada en isopropanolol (Fisher #A-416) a volúmenes iguales a -20°C durante al menos 2 horas. El ARN fue centrifugado a 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El pellet de ARN fue lavado con etanol (Pharmco #64-17-5, Bayonne, NJ) al 80% a volúmenes iguales centrifugando a 14000 rpm a 4°C durante 6 minutos. El pellet de ARN fue secado durante 8 minutos en bomba de vacío (SpeedVac Water Jet, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY) y disuelto en 40 µl de agua destilada tratada con dietilpirocarbonato 0.1% (DEPC, Sigma #D-5758). Para facilitar la disolución, el ARN fue calentado en un baño de agua (Reacti-therm heating module, modelo #18870, Pierce) a 62-70°C durante

10 minutos. Se agitó en vortex y se centrifugó brevemente. La cantidad del ARN fue medida en un espectrofotómetro (Beckman DU-64, Fullerton, CA) a una densidad óptica de 260 nm, la media obtenida fue de 1  $\mu\text{g}$  por cada  $1 \times 10^6$  células.

La calidad del ARN fue comprobada en un gel de agarosa (Gibco BRL #5510UB, Gaithersburg, MD) al 1.2% (4 mm de grosor). El gel fue preparado disolviendo la agarosa en agua destilada en microondas, enfriando a 60°C y añadiendo 5x bufer MOPS y formaldehído (37% en solución acuosa, Fisher #F79) a una concentración final de 1x y 2.2 mM respectivamente. El bufer MOPS contenía: 0.1 M 3-(N-morpholino) ácido propanesulfónico (Sigma #M-8899), 40 mM acetato sódico (Fisher #209) y 5 mM EDTA (ácido etilen-diamino tetra-acético, Sigma #E5134) en agua DEPC. Se añadió a la muestra de ARN, 7  $\mu\text{l}$  de bufer cóctel (5x bufer MOPS, formaldehído, formamida (Sigma #7508) y 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bromuro de etidio (Sigma #E-8751)) en un volumen final de aproximadamente 10  $\mu\text{l}$ . Se calentó a 62-70°C durante 10 minutos. Se añadió 1.6  $\mu\text{l}$  de bufer de carga, que contenía: 50% glicerol (Sigma #G5516), 1 mM EDTA, 0.25% bromofenol azul (Sigma #B5525) y 0.25% cianol xileno FF (Bio-Rad #161-0423) en agua DEPC. Se cargó la muestra en el gel sumergido en 1x bufer MOPS y se corrió a 3-4 V/cm (cm entre los electrodos). Se usaron cubetas de electroforesis Bio-Rad (Richmond, CA).

### 1. 1. 10 TRANSCRIPTASA INVERSA

El ADNc fue sintetizado a partir de 1 µg del ARN total con 200 U de transcriptasa inversa de virus Moloney de la leucemia murina (Bethesda Research Laboratories #8025SA, Gaithersburg, MD) y 100 pmol de oligodT (pd(T)12-18, Pharmacia #27-7858-01, Uppsala, Suecia) en presencia de 1 mM dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato) (Pharmacia #27-2035-01), 20 U inhibidores de ARNasas de placenta humana (Boehringer Mannheim #799017), 4 µl de 5x bufer de amplificación (BRL #Y00146) y agua destilada esterilizada hasta completar un volumen final de reacción de 20 µl. Los cebadores y el ARN fueron alineados a 72°C durante 5 minutos y posteriormente enfriados gradualmente hasta 10°C durante 30 minutos. A continuación se añadió la transcriptasa inversa y la reacción se dejó proceder durante 60 minutos a 37°C antes de desnaturalizar a 95°C durante 7.5 minutos <sup>136</sup>.

### 1. 1. 11 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RCP).

#### SECUENCIACION DE ADN

El ADNc fue amplificado mediante RCP en un termociclador (480, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) con Taq polimerasa (Boehringer Mannheim #1435094 5U/µl). Los cebadores usados para amplificación (todos en orientación 5'→3') del FasR, ligando del Fas y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) están descritos en la siguiente tabla.



Sentido

Antisentido

**GAPDH**

CCATCACCATCTTCCAGGAG

CCTGCTTCACCACCTTCTTG

**FASL**

Rata CAACTCTTTCATCTACAGAAGGAACT AAGCTTATATAAGCCAAAAAAGG

Ratón CATGCAGCAGCCCATGAATTAC

CCATGGACCTCGAGAAAATGAAGG

**FASR**

Ratón ATGCTGTGGATCTGGGCTGT

TCTCCTCTTTCATGGCTGG

Los cebadores fueron sintetizados en la Sección de Biología Molecular del Hospital for Special Surgery. El bufer de reacción, con un volumen final de 25 µl en tubos de 0.5 ml (GeneAmp Reaction tubes #N801-0180), contenía: Taq polimerasa 0.625 U (0.5 µl), dNTPs 5 mM cada uno (0.5 µl), cebadores 5' y 3' 12.5 µmol en 5 µl, 2.5 µl de 10x Taq bufer+magnesio (Boehringer Mannheim #1271318), 5 µl del ADNc en dilución apropiada y agua destilada autoclavada hasta completar un volumen final de 25 µl. Antes de iniciar la RCP, se cubrió el contenido de los tubos con aceite mineral (Sigma #M-5904), se centrifugó 30 segundos a 10000 rpm y se calentó a 94°C durante 1 minuto para desnaturalizar el ADN. Mediante estudios preliminares observamos que la

cuantificación óptima se obtenía con 30 ciclos de amplificación y una dilución del ADNc del FasR y del ligando del Fas 1/5 y de GAPDH 1/320. Como control negativo se usó una muestra que contenía todos los ingredientes del bufer de reacción excepto el ADNc. Se emplearon las siguientes condiciones para amplificación: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento a 5°C por debajo del T<sub>m</sub> ("temperature melting", temperatura de disociación de las cadenas del ADN) durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto. Tras la RCP, 10 µl de ADN de cada muestra fueron corridos en un gel de poliacrilamida (BDH Laboratory Supplies #44299, Poole, Inglaterra) al 5% con 1 µg/ml de bromuro de etidio en bufer TBE (0.045 M Tris-borato (Sigma #B-7901) 0.001 M EDTA). El bufer de electroforesis usado fue TBE con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Los geles fueron expuestos a un transiluminador de luz ultravioleta (UvP INC., modelo TS-15, San Gabriel, CA) y se fotografiaron con un vídeo (American Scientific Inc., Pleasanton, CA) en modo inverso de forma que el ADN teñido aparecía como bandas de color negro. La cantidad relativa del ADN amplificado se cuantificó mediante densitometría de láser (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Los productos de RCP fueron subclonados en pGEM3 (Promega Biotec, Madison, WI) y secuenciados por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos<sup>202</sup> usando ADN polimerasa T7 modificada. Todos los componentes se obtuvieron del equipo Sequenase versión 2.0 ADN Sequencing Kit (United States Biochemical #70770, Cleveland, OH) y la reacción fue realizada amablemente por JL Chu según las

recomendaciones del fabricante.

#### 1. 1. 12 SONDAS DE ADNc

Se obtuvo una sonda de ADNc de 1kilobase que codificaba para el receptor del Fas de ratón, de timo de MRL/++<sup>136</sup>.

Las sondas de ADNc que codificaban para el ligando del Fas de rata y ratón fueron obtenidas respectivamente de células de bazo de rata Sprague-Dawley activadas con concanavalina A 2 µg/ml durante 24 horas a 37°C<sup>4</sup> y células no manipuladas de ganglios linfáticos de ratón MRL/lpr<sup>6</sup>.

#### 1. 1. 13 "NORTHERN BLOT"

El pellet de 10 µg de ARN fue secado en bomba de vacío, se añadió bufer cóctel hasta un volumen final de 18 µl, se calentó, y se corrió en un gel de agarosa al 1.2% en condiciones desnaturalizantes. Se realizó el mismo procedimiento ya descrito para análisis del ARN, salvo por el bufer cóctel que no contenía bromuro de etidio.

A continuación el ARN fue transferido por capilaridad a membranas de nylon (Zeta Probe blotting membranes #162-0156, Bio-Rad, Richmond, CA). Sobre un soporte sumergido en una cubeta rellena de 10x SSC se colocaron sucesivamente: 3 hojas de papel Whatman (Whatman International Ltd #1001 917, Maidstone, Inglaterra), el gel

invertido, Parafilm (American National Can, Greenwich, CT) alrededor del gel sin cubrirlo, membrana de nylon, 2 hojas de papel Whatman, 15 cm de servilletas y un peso de 1 kg para hacer presión. El bufer de transferencia 10x SSC contenía: 3 M NaCl, 0.3 M acetato trisódico (Fisher #5-279). Tras realizar la transferencia durante una noche, se lavó la membrana con 2x SSC y se dejó secar a TA.

La membrana fue sellada en un bolsa de plástico. La prehibridación, hibridación y lavados fueron llevados a cabo según las instrucciones del fabricante de la membrana. La prehibridación se realizó en 1 mM EDTA, 0.5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2 (Fisher #S-369) y 7% SDS (sodio dodecil sulfato, BDH Laboratory Supplies #44244, Poole, Inglaterra) a 65°C durante 5 minutos. La hibridación fue llevada a cabo en la misma solución conteniendo la sonda de ADNc a 65°C durante 24 horas. El volumen final de la solución de pre e hibridación fue de 150  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de membrana. La sonda de ADNc marcada con  $^{32}\text{P}$  ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP, NEN Products, Dupont de Nemours and Co., Boston, MA) fue añadida a una concentración de  $1 \times 10^6$  cuentas por minuto (cpm) por ml de solución de hibridación. La membrana fue sucesivamente hibridada con sondas de ADNc que codificaban para el receptor del Fas, el ligando del Fas y el ADN control GAPDH. La membrana fue lavada entre cada sonda. Tras la hibridación, se realizaron dos lavados con 1 mM EDTA, 40 mM  $\text{NaHPO}_4$  pH 7.2 y 5% SDS y dos lavados con 1 mM EDTA, 40 mM  $\text{NaHPO}_4$  pH 7.2 y 1% SDS. Todos los lavados se realizaron a 65°C durante 60 minutos cada uno en un volumen final de 350  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de membrana. En el caso del ADNc

del ligando del Fas de rata, que tiene una homología del 91% con el del ratón <sup>6</sup>, el lavado se hizo a 50°C en lugar de a 65°C. La pre e hibridación fueron realizadas en una incubadora Robbins Scientific modelo 310 (Sunnyvale, CA) y los lavados en un baño Stovall (The belly dancer, Life Science Inc., Greensboro, NC).

Las membranas fueron fijadas por radiaciones ultravioleta (GS Gene linker UV chamber #165-5031 Bio-Rad, Richmond, CA) y expuestas a autorradiografías (Eastman Kodak Co., X-OMAT #165 1512, Rochester, NY) durante una noche a -70°C (Revco Scientific Inc., modelo ULT1775-7-AUB, Asheville, NC). Los niveles de expresión de ARNm fueron cuantificados mediante análisis de las autorradiografías con densitometría de láser (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) y fueron expresados como el cociente Fas receptor o ligando / GAPDH x100.

#### 1. 1. 14 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO PARA HISTOLOGIA

Se extrajeron de ratones Balb/c y MRL/lpr los siguientes órganos: cerebro, timo, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, intestino delgado, colon, ovarios y ganglios linfáticos. Tras su extracción, los órganos fueron inmediatamente inmersos en OCT (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Miles Inc. #4583, Elkhart, IN) en moldes de polivinilo (disPo Base Mold, Baxter Healthcare Corporation #M7307-4, Scientific Products Division, Mc Graw Park, IL), congelados en nitrógeno líquido (T.W.Smith Corp., Brooklyn, NY) y guardados a -70°C. Se cortaron secciones congeladas de 1 cm<sup>2</sup> y 3 µm de grosor en un microtomo Micron (modelo HM505M, Belair Instruments Co., Fanwood, NJ). Las secciones fueron colocadas en porta-objetos pretratados (Superfrost Plus microscope slides, Fisher Scientific #12-550-15, Pittsburg, PA), secadas a TA durante 6-8 horas y guardadas a -70°C. Antes de realizar la tinción, las secciones fueron de nuevo secadas a TA durante 30 minutos y fijadas en acetona (Fisher #A18-4, Fair Lawn, NJ) y metanol (Fisher #A412-20) fríos en una proporción 3:1 durante 1 minuto a 4°C, seguido de tres lavados con BSF.

#### 1. 1. 15 TINCION CON INMUNOPEROXIDASA

Los porta-objetos fueron colocados en 2% ASB / BSF durante 1 hora a TA, seguido de preincubación con 5% suero de cabra supresor (Cappel #55984, Durham, NC) en 2% ASB / BSF durante 30 minutos a TA. Las secciones de hígado y riñón fueron pretratadas con avidina seguida de biotina (Vector Laboratories #SP-2001, Burlingame,

CA), cada paso durante 15 minutos a TA para bloquear la biotina endógena de estos tejidos. Posteriormente se aplicó el anticuerpo policlonal mono específico FasR IgG F(ab')<sub>2</sub> conejo anti-ratón <sup>199</sup> en una concentración de 25 µg/ml durante una noche a TA. Tras lavar con BSF, las secciones fueron incubadas con IgG biotinilada cabra anti-conejo (Vector #BA-1000) diluída 1:2000 en 0.5% ASB / BSF durante 10 minutos a TA, seguido de 1% peróxido de hidrógeno (Fisher #H325-100) en BSF durante 5 minutos con objeto de bloquear la peroxidasa endógena. Tras lavar con BSF, fueron incubadas con peroxidasa conjugada a streptavidina (Boehringer-Mannheim #1089 153, Alemania) diluída 1:1000 en 0.5% ASB / BSF durante 5 minutos a TA. Como sustrato cromógeno para el enzima se usó diaminobencidina (Sigma #D8001) 0.06% / 0.005% peróxido de hidrógeno diluída en 0.5% Triton (Sigma #X-100) / BSF durante 5-10 minutos a TA <sup>203</sup>. La reacción con la peroxidasa resultó en un precipitado marrón. Los porta-objetos fueron contrateñidos ligeramente en hematoxilina de Harris (Fisher #SH26-500), seguido de hidróxido de amonio (Fisher #A669-500) en agua, deshidratados en etanoles al 95% y 100% sucesivamente, aclarados en xileno (Fisher #X4-4), montados en Permount (Fisher #SP15-100) y cubiertos. Las secciones fueron evaluadas en un microscopio Olympus, Japón.

Se realizaron en paralelo controles negativos, bien omitiendo el anticuerpo primario o sustituyéndolo por IgG F(ab')<sub>2</sub> de conejo no immune irrelevante. No se observó tinción en estos casos.

Como tinción histológica de rutina se utilizó hematoxilina-eosina (Fisher #E-511).

#### 1. 1. 16 INMUNOMICROSCOPIA ELECTRONICA

Se utilizó un método de preinmersión, y todo el proceso antes de la fijación se realizó en condiciones estériles para evitar contaminación. Se extrajeron timos de ratones Balb/c y MRL/lpr y se obtuvo una suspensión celular como ya se describió. Se preincubaron  $5 \times 10^6$  células con 5% suero de cabra en BSF durante 30 minutos a TA. Se añadió el anticuerpo anti-FasR IgG F(ab')<sub>2</sub> conejo anti-ratón<sup>199</sup> en una concentración de 50 µg/ml diluido en 5% ASB / BSF durante 1 hora a TA. A continuación se lavaron las células tres veces con 1% ASB / 1% azida sódica / BSF centrifugando a 1000 rpm 10 minutos cada vez y se incubaron con IgG (H+L) cabra anti-conejo conjugada con partículas de oro de 10 nm (TedPella Inc. #15726, Redding, CA) diluída 1:10 en bufer Tris pH 8.2 durante 1 hora a TA. El bufer Tris contenía los siguientes ingredientes: 20 mM Tris, 20 mM NaN<sub>3</sub>, 225 mM NaCl, 0.1 g ASB, pH 8.2. Tras tres lavados como se describió anteriormente, las células fueron fijadas en un pellet con glutaraldehído / formaldehído al 3% cada uno en 0.1 M BSF (Electron Microscopy Sciences, PA) durante una noche a 4°C. Posteriormente el fijativo fue extraído y reemplazado con 0.09 M BSF dos veces, cada una 15 minutos. El pellet fue fijado posteriormente con 2% tetróxido de osmio (Stevens Metallurgical Corp., NY) en 0.09 M BSF durante 45 minutos a TA y a continuación lavado tres veces con agua destilada 5 minutos cada uno. Se siguió de deshidratación en etanoles sucesivamente al 25, 50, 70, 95 y 100% durante 15 minutos



\_\_\_\_\_

cada uno. Los pellet fueron inmersos sucesivamente en óxido de propileno (Eastman Kodak Co., #75-56-9, Rochester, NY) durante 15 minutos, óxido de propileno y mezcla epoxy en una proporción 1/1 durante 45 minutos a TA y dos cambios de la mezcla epoxy durante 1 hora cada uno a TA. La mezcla epoxy contenía: 72% Maraglas 655 (Electron Microscopy Sciences, Port Washington, PA), 16% epi-res 502 (Fisher), 10% dibutil phthalato (Fisher #D30-500), 2% benzildimetilamina (Ladd Research Industries #412, Burlington, VT). Finalmente fueron polimerizados a 58°C (Precision Scientific Group #31578, Chicago, IL) durante una noche<sup>204</sup>. Las secciones fueron cortadas a 900 nm de grosor en un ultramicrotomo Reichert (Leica, Alemania) y recogidas en rejillas de cobre (Ladd, Inglaterra). Se tiñeron con acetato de uranil (Reichert-Jung #2168-200) durante 42 minutos a 40°C y citrato de plomo (Leica #70 55 30) durante 16 minutos a 20°C (Ultrastainer Carlsberg System). Fueron examinadas en un microscopio electrónico Zeiss EM 109, Alemania.

Los controles negativos se realizaron del mismo modo que ya se describió para la inmunohistoquímica; no se encontró tinción en ellos.

## 1. 2 ESTUDIOS EN HUMANOS

### 1. 2. 1 PACIENTES

Se estudiaron 23 pacientes con LES, 9 pacientes con artritis reumatoide (AR), 6 pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSP), y un control sano por cada paciente. Todos los pacientes con LES y AR reunían los criterios de la Sociedad Americana de Reumatología <sup>205, 206</sup>. Los pacientes con SSP presentaban queratoconjuntivitis seca, xerostomía y una biopsia labial diagnóstica en ausencia de otra enfermedad autoinmune conocida <sup>207</sup>. Los pacientes fueron seleccionados aleatoriamente en el Hospital for Special Surgery de forma consecutiva no randomizada. Los pacientes en tratamiento con citotóxicos o una dosis de prednisona superior a 10 mg / día fueron excluidos del estudio. La actividad del LES fue evaluada mediante el índice de actividad del LES (SLEDAI) <sup>208</sup>. Para no introducir errores de variación, las muestras de sangre de los pacientes y los controles sanos fueron pareadas y analizadas el mismo día y en las mismas condiciones.

### 1. 2. 2 PREPARACION DE LA SUSPENSION CELULAR

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante centrifugación en Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB #17-0840-03, Uppsala, Suecia) <sup>209</sup>. Se diluyó la sangre heparinizada a partes iguales con medio RPMI 1640, y lentamente se

decantaron 25 ml de la dilución en tubos de 50 ml (Falcon #2070) previamente rellenos con 15 ml de Ficoll, se centrifugó a 1500 rpm sin freno durante 30 minutos a TA. Las células mononucleares de la interfase Ficoll-plasma fueron transferidas cuidadosamente a un nuevo tubo de 50 ml, se añadió 3 volúmenes de nuevo medio y se lavaron tres veces centrifugando a 1000 rpm 15 minutos a 4°C. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer. Se obtuvieron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por cada 1 ml de sangre.

### 1. 2. 3 ANTICUERPOS

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

-anti-APO-1 (APO-1/FasR) ratón anti-humano, IgG1 para citometría de flujo e IgG3 para ensayo de apoptosis, cedidos por el Dr. P. Krammer, German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania <sup>2</sup>.

-OKT3 (CRL 8001), anti-CD3, IgG2 ratón anti-humano, hibridoma de ATCC <sup>210</sup>.

-2H4-RD1, anti-CD45RA, IgG1 cadenas pesadas y Kappa ligera ratón anti-humano PE conjugado (Coulter Immunology #6603181, Hialeah, FL) <sup>211</sup>.

-4B4-RD1, anti-CDw29, IgG1 cadenas pesadas y Kappa ligera ratón anti-humano PE conjugado (Coulter Immunology #6603177, Hialeah, FL) <sup>212</sup>.

-B4-RD1, anti-CD19, IgG1 cadenas pesadas y Kappa ligera ratón anti-humano PE conjugado (Coulter Immunology #6603024, Hialeah, FL) <sup>213</sup>.

-Anti-Leu-3a, anti-CD4, IgG1 cadenas pesadas y ligeras ratón anti-humano (Becton

Dickinson #6320, Mountain View, CA) <sup>214</sup>.

-Anti-Leu-2a, anti-CD8, IgG1 cadenas ligeras y pesadas ratón anti-humano (Becton Dickinson #6310, Mountain View, CA) <sup>214</sup>.

Los anticuerpos control isotipo fueron: IgG1 y IgG3, ambos de ratón y obtenidos de Sigma Chemical Co (#M5284 y M5659 respectivamente), St Louis, MO.

Los anticuerpos secundarios fueron:

-IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub> cabra anti-ratón (preadsorbido para evitar reactividad con IgG humana) FITC conjugado (Jackson #115-096-062).

-IgM burro anti-humano PE conjugado (Jackson).

-IgM fragmento Fc cabra anti-humano FITC conjugado (Jackson #109-095-043).

-IgG (H+L) cabra anti-ratón PE conjugado (Caltag #M30004-1).

#### 1. 2. 4 ANALISIS DE CITOMETRIA DE FLUJO

La tinción y el análisis de las muestras se realizó en las mismas condiciones ya descritas para los estudios en ratones.

#### 1. 2. 5 CULTIVO CELULAR Y ACTIVACION "IN VITRO"

Se cultivaron  $2 \times 10^6$  CMSP/ml en medio RPMI 1640 suplementado (suero de ternera fetal, L-glutamina y antibióticos en las concentraciones ya descritas en los

estudios en ratones) en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon).

Se usaron como activadores:

-para células T: anti-CD3 (OKT3) 1/5000 dilución de líquido ascítico e IL-2 recombinante humana 100 U/ml (Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ).

-Para células B: Estafilococo Aureus Cowan cepa 1 (SAC) muerto (Calbiochem-Nova biochem, La Jolla, CA) a una concentración final de 0.02% e IL-2 100 U/ml. Se usaron estos estimuladores porque previamente se había demostrado que aumentaban la expresión de APO-1 <sup>215</sup>.

La viabilidad celular se determinó mediante exclusión con tripán azul.

#### 1. 2. 6 AISLAMIENTO DE CELULAS B

Las células B fueron seleccionadas mediante selección negativa <sup>216</sup>. Las células T fueron depleccionadas mediante formación de rosetas con hematíes de carnero (Beckton Dickinson #11943) pretratados con neuraminidasa (neuraminidasa de Clostridium perfringens, Sigma #N-02876). Se lavaron 25 ml de hematíes de carnero con 25 ml de medio Hanks (HBSS, Gibco Laboratories #450-1250EA, Grand Island, NY) en tubos de 50 ml centrifugando 3 veces a 2000 rpm 10 minutos a TA. A 1 ml del pellet de hematíes de carnero se añadió 1 ml de neuraminidasa 1 U/ml en BSF y se incubó 1 hora a 37°C. Se lavó 2 veces con medio Hanks centrifugando como antes y se resuspendió

el pellet final en 49 ml de RPMI suplementado (concentración al 2%). A la solución de células mononucleares resuspendidas a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml se añadió medio volumen de los hematíes de carnero tratados con neuraminidasa al 2%. Se incubó 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , se centrifugó 10 minutos a 500 rpm a TA y se incubó durante una noche a  $4^\circ\text{C}$ . Se resuspendió en 10 ml de medio Hanks y se decantó cuidadosamente para no mezclarse en un tubo con 10 ml de Ficoll. Se centrifugó 30 minutos a 1500 rpm a TA, se recogieron las células B de la interfase y se lavaron 3 veces con medio Hanks. Las células residuales fueron eliminadas mediante incubación con bolas magnéticas (Dynal #14003) cubiertas con anti-CD3 (OKT3). La población B resultante mostró una pureza superior al 95% mediante citometría de flujo usando anti-CD19 y anti-CD3.

#### 1. 2. 7 ENSAYO DE PROLIFERACION

Se realizó mediante incorporación de timidina tritiada. Se cultivaron  $10 \times 10^4$  CMSP en un volumen de 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo en placas de 96 pocillos (Falcon #3077). Ocho horas antes de ser recogidas, se añadió a cada pocillo 1  $\mu\text{Ci}$  (micro-curio) de timidina tritiada (NEN Products #NET-027A, Dupont de Nemours and Co., Boston, MA). Las células fueron aspiradas en filtros de fibra de vidrio en un PHD (ambos de Whittaker M.A. Bioproducts, Walkersville, MD). La incorporación de radioactividad fue medida en un contador  $\beta$  (Packard Instruments Co., Downers Grove, IL). Todas las muestras se midieron por triplicado.

## 1. 2. 8 INDUCCION Y ENSAYO DE APOPTOSIS

Inmediatamente tras aislamiento de las CMSP frescas o en diferentes tiempos de cultivo, se cultivaron  $2 \times 10^6$  células con  $1 \mu\text{g/ml}$  de IgG3 anti-APO-1 o el anticuerpo control isotipo, junto con  $0.8 \mu\text{g/ml}$  de IgG fragmento Fc conejo anti-ratón (Jackson #315-006-046) para optimizar el entrecruzamiento <sup>87</sup>. Después de 12 horas, se determinó la viabilidad celular mediante exclusión con tripán azul y la proliferación mediante incorporación de timidina tritiada como ya se ha descrito previamente. El análisis cualitativo de apoptosis se realizó mediante una modificación del ensayo de fragmentación de ADN <sup>13</sup>. El pellet de  $2 \times 10^6$  células fue lisado incubándolo durante una noche a  $37^\circ\text{C}$  en un bufer que contenía  $10 \text{ mM}$  Tris pH 7.4,  $5 \text{ mM}$  EDTA,  $0.5\%$  sarkosil (N-Lauroylsarcosine, Sigma #L9150) y  $0.5 \text{ mg/ml}$  proteinasa K (Boehringer Mannheim #745 723). A continuación se incubó 90 minutos a  $50^\circ\text{C}$  con  $0.1 \text{ mg/ml}$  de ARNasa libre de ADNasa (Boehringer Mannheim #109 169). Los lisados celulares fueron centrifugados. El ADN del sobrenadante fue extraído a volúmenes iguales con fenol (Sigma #P-1037) / cloroformo y a continuación con cloroformo / alcohol isoamílico. Posteriormente el ADN se precipitó a  $-70^\circ\text{C}$  durante 30 minutos con  $0.1$  volumen de acetato sódico  $3 \text{ M}$  y 2 volúmenes de etanol al  $95\%$ . Se centrifugó y lavó con etanol al  $70\%$ , se secó al vacío y se resuspendió en  $10 \text{ mM}$  Tris  $1 \text{ mM}$  EDTA. El ADN fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al  $2\%$  y  $1 \mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio y fotografiado con un vídeo <sup>136</sup>.

### 1. 2. 9 SEROLOGIA

Fue realizada en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital for Special Surgery. La velocidad de sedimentación (VSG) fue determinada por el método de Westergren <sup>217</sup>. Los anticuerpos antinucleares (ANA) fueron cuantificados en tiras cubiertas con Hep-2 (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD) usando un fluorímetro (International Diagnostic Technologies, Santa Clara, CA) <sup>218</sup>. Los anticuerpos anti-ADN nativo fueron cuantificados en porta-objetos cubiertos con Crithidia Lucifae <sup>219</sup> (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ) y fueron medidos en una escala visual de 0 a 4.

### 1. 2. 10 ANALISIS ESTADISTICO

La significación estadística se comprobó mediante comparación de medias según t de Student para datos no paramétricos y el test de Mann-Whitney rank sum para datos no paramétricos. Los niveles de significación elegidos fueron:  $p < 0.05$ , significativo y  $p < 0.01$ , muy significativo.



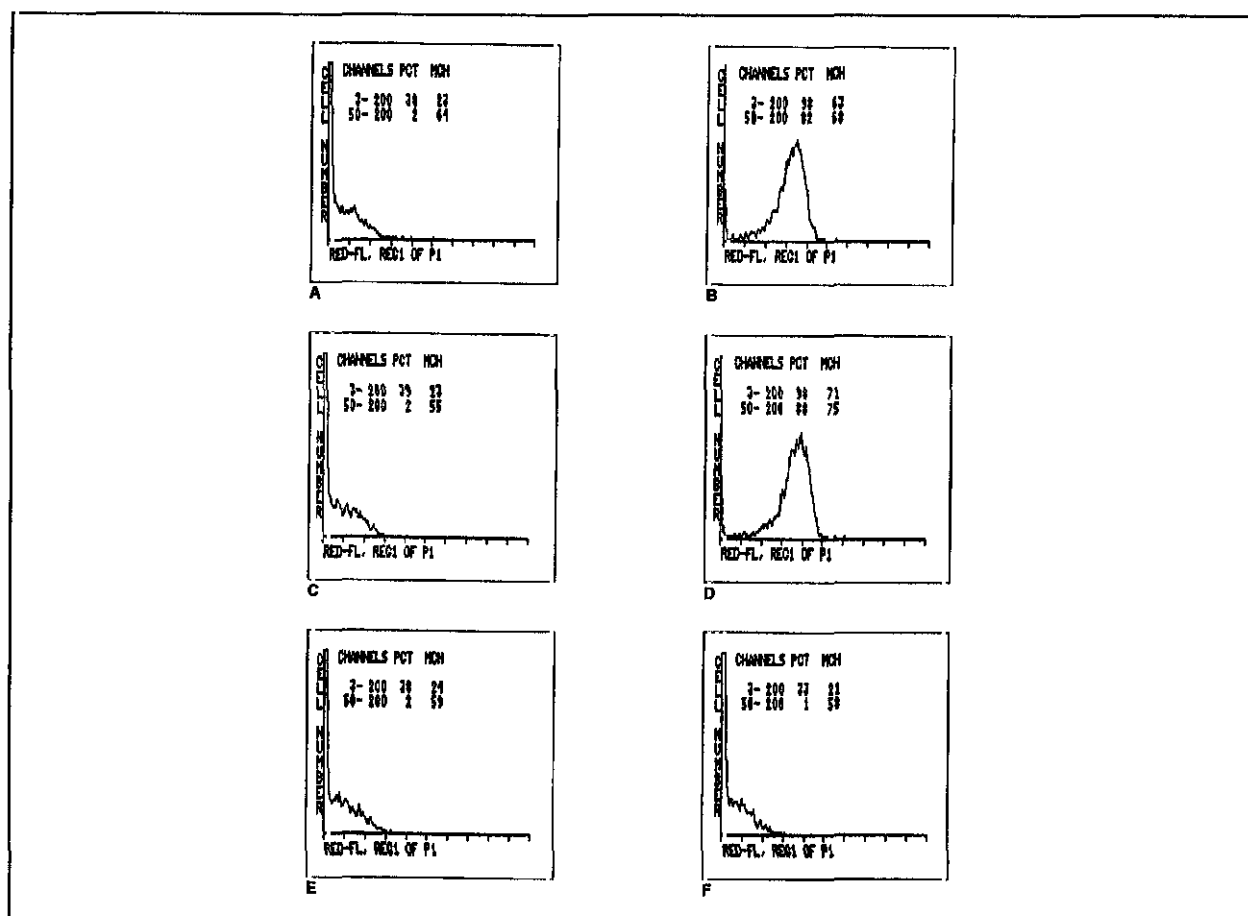
## **IV. 2 RESULTADOS**

## **2. 1 ESTUDIOS DEL FASR EN RATONES**

### **2. 1. 1 ANALISIS CITOMETRICO DEL FASR EN RATONES**

#### **2. 1. 1. 1 EXPRESION DEL FASR EN LA POBLACION TOTAL DE TIMO**

Se analizó la expresión del FasR en células frescas de timo de 4-6 ratones por cada cepa de 4-6 semanas de edad mediante citometría de flujo utilizando el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo anti-FasR conejo anti-ratón<sup>199</sup>. Los timocitos frescos de ratones Balb/c y MRL/++ expresaban el antígeno FasR en un 85% (media ± desviación standar (DE) = 84± 9%). Por el contrario, menos del 2% de los timocitos de MRL/lpr expresaban el FasR. Este bajo nivel de expresión era equiparable al obtenido con el anticuerpo control IgG fragmento F(ab')<sub>2</sub> de conejo no inmunizado (Figura 1).



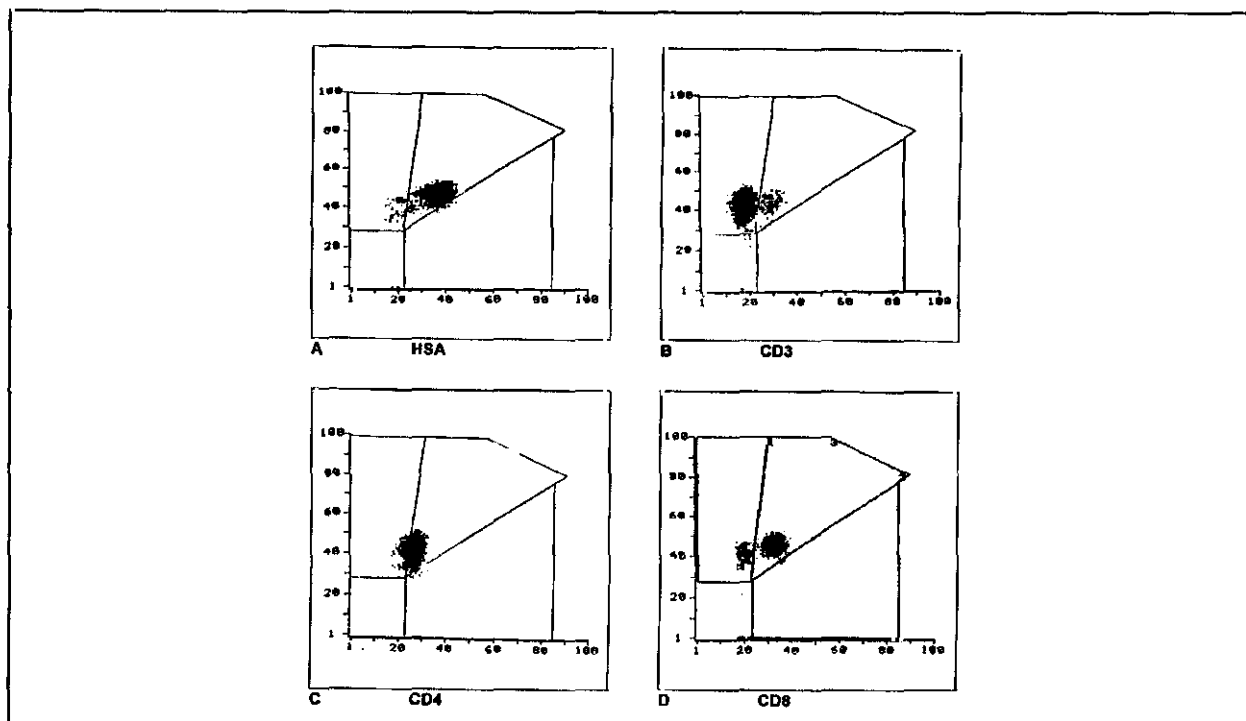
**Figura 1.** Expresión del FasR (B, D, F) o del anticuerpo control (A, C, E) en la población total de timo de ratones Balb/c (A, B), MRL/++ (C, D) y MRL/lpr (E, F) mediante citometría de flujo como se describió en métodos. Se muestran los resultados del timo de un ratón representativo por cada cepa estudiada. En las ordenadas se representa el número de células y en las abcisas la intensidad de fluorescencia expresada en escala logarítmica. La proteína FasR se detectó en un 85% de los timocitos de las cepas Balb/c y MRL/++ (B, D) y en menos del 2% de los timocitos de la cepa MRL/lpr (F).

## 2. 1. 1. 2 EXPRESION DEL FASR EN LAS SUBPOBLACIONES DE TIMO

TIMOCITOS CD4+CD8+. Como la mayoría de los timocitos (~80%) son CD4+CD8+ (dobles positivos) y un 85% de la población total de timocitos expresa el FasR, se puede deducir que la mayoría de los timocitos dobles positivos expresan el FasR. Para confirmarlo, se realizó doble tinción para el FasR y HSA. HSA se expresa en un gran porcentaje de los timocitos dobles positivos y dobles negativos. Se encontró que aproximadamente un 75% de los timocitos de ratones Balb/c que expresaban HSA a una alta intensidad expresaban también el FasR (Figura 2A).

TIMOCITOS CD4+CD8- y CD4-CD8+. Para determinar el nivel de expresión en la población más madura se realizó doble tinción para el FasR y anti-CD3. CD3 de alta intensidad se expresa preferentemente en células CD4+CD8- o CD4-CD8+. Se seleccionó un área de modo que sólo la población CD3+ de alta intensidad, pero no la CD3+ de intensidad intermedia o baja, fuera incluida como positiva. Se encontró que aproximadamente un 15% de las células CD3+ de alta intensidad expresaban el FasR (Figura 2B).

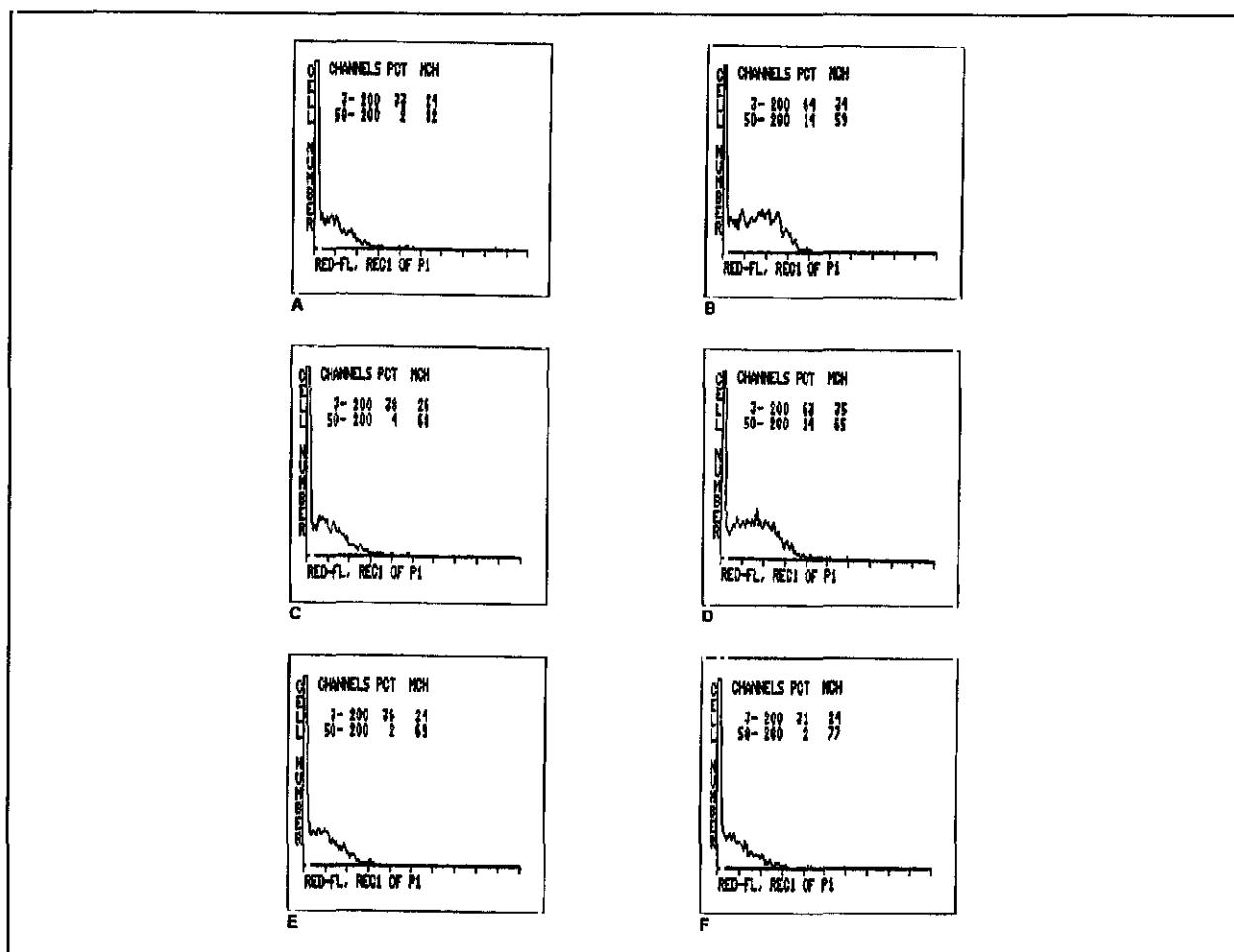
TIMOCITOS CD4-CD8-. Estas células sólo comprenden un 5% de la población total de timocitos. Se realizó doble tinción para el FasR y anti-CD4 o anti-CD8. Se encontró que un 33% de las células que no teñían para CD4 o para CD8 expresaban el FasR (Figura 2C y D).



**Figura 2.** Expresión del FasR (eje y) en las subpoblaciones (eje x) de células HSA+ (A), CD3+ (B), CD4+ (C) o CD8+ (D) de timo de ratones Balb/c de 6 semanas de edad mediante doble tinción con citometría de flujo. Se muestran los resultados del timo de un ratón Balb/c representativo. Un 75% de los timocitos de ratones Balb/c co-expresaban el FasR y HSA (A). Un 15% de los timocitos co-expresaban el FasR y CD3 de alta intensidad (B). Como un 85% de los timocitos co-expresaban el FasR y CD4 (C) y un 60% co-expresaban el FasR y CD8 (D), deduciendo estas cifras del total de timocitos que expresaban el FasR (89%), se obtuvo que un 33% de los timocitos que no expresaban CD4 o CD8 expresaban el FasR.

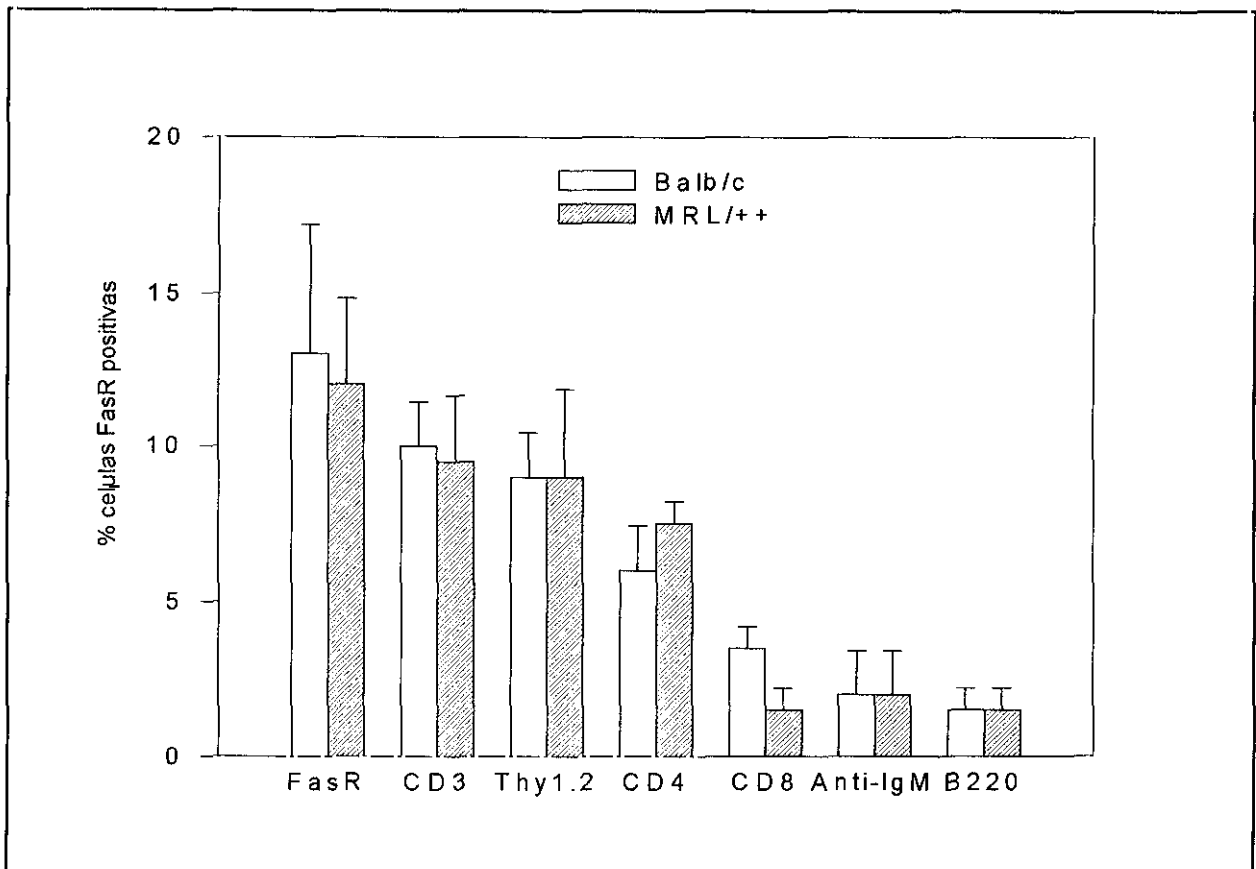
### 2. 1. 1. 3 EXPRESION DEL FASR EN CELULAS DE BAZO EN REPOSO

Se analizó la expresión del FasR en células frescas de bazo de 4-6 ratones por cada cepa estudiada de 4-6 semanas de edad mediante citometría de flujo utilizando el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo anti-FasR conejo anti-ratón<sup>199</sup>. Se detectó el FasR en un 12% (media±DE = 12± 4%) de la población total de bazo de ratones Balb/c y MRL/++. En ratones MRL/lpr la expresión fue de un 2%, valor equivalente al del anticuerpo control IgG fragmento F(ab')<sub>2</sub> de conejo no inmunizado (Figura 3).



**Figura 3.** Expresión del FasR (B, D, F) o del anticuerpo control (A, C, E) en células frescas de bazo de ratones Balb/c (A, B), MRL/++ (C, D) y MRL/lpr (E, F) mediante citometría de flujo como se describió en la figura 1. Se muestran los resultados del bazo de un ratón representativo por cada cepa estudiada. La proteína FasR se detectó en un 12% de las células de bazo de las cepas Balb/c y MRL/++ (B, D) y en un 2% en la cepa MRL/lpr (F).

Se realizó doble tinción para el FasR y CD3, HO, CD4, CD8, IgM de superficie o B220, para analizar la expresión en células T CD3+, CD4+, CD8+ o B respectivamente en ratones Balb/c y MRL/++ de 4-6 semanas de edad. Se detectó que la expresión del FasR se debía fundamentalmente a las células CD4+ (Figura 4).

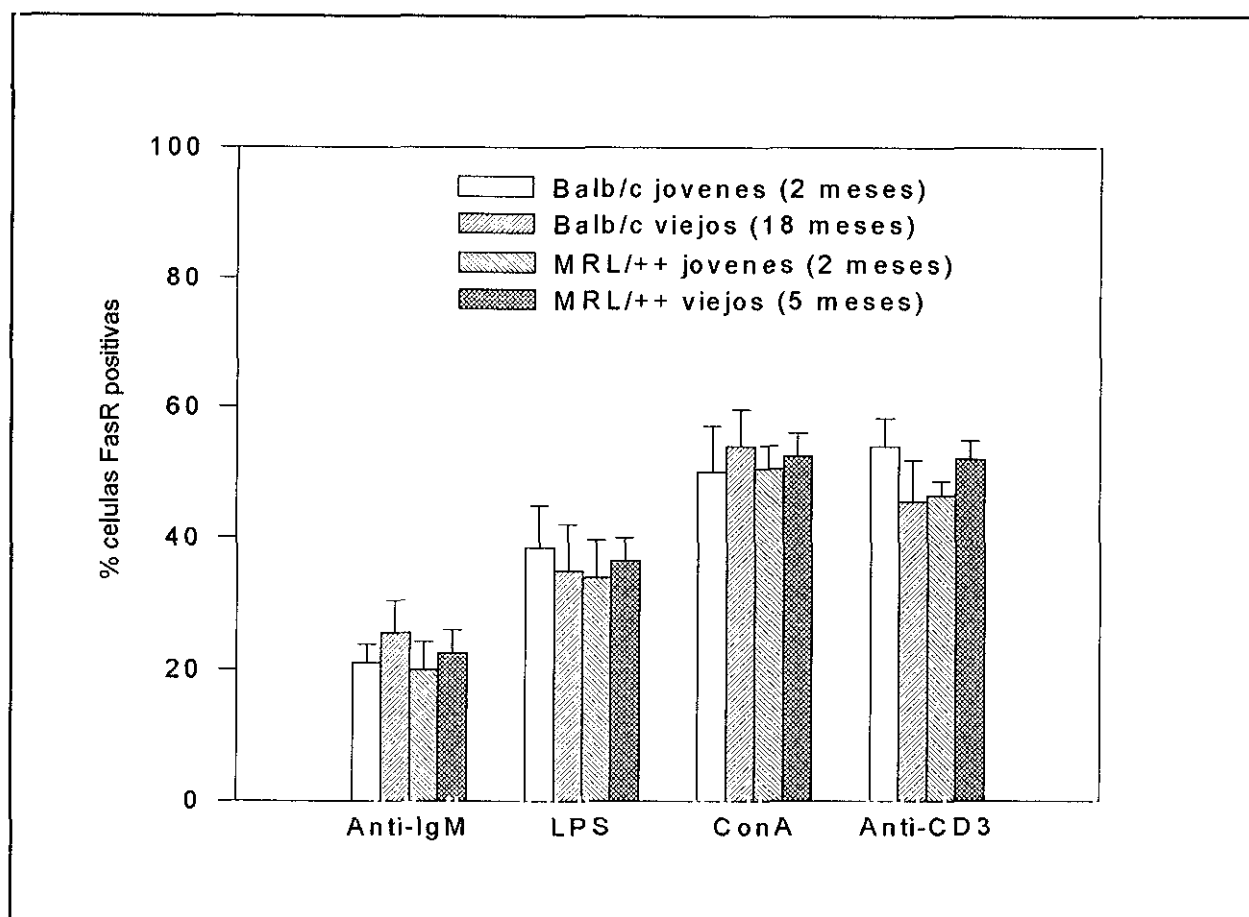


**Figura 4.** Expresión del FasR en las subpoblaciones de células frescas de bazo mediante doble tinción con citometría de flujo. Se muestra la media de los resultados de la expresión del FasR de 4-6 ratones por cada cepa estudiada sustraído el valor del anticuerpo control. Se obtuvo la máxima expresión del FasR en las células con marcadores T (CD3 y Thy 1.2), y dentro de éstas en la subpoblación CD4.



#### 2. 1. 1. 4 EXPRESION DEL FASR EN CELULAS DE BAZO ESTIMULADAS

Para analizar si la expresión del FasR en células de bazo en reposo cambiaba al ser estimuladas, se incubaron las células de ratones Balb/c y MRL/++ con mitógenos para células B (LPS o IgM cabra anti-ratón) y para células T (concanavalina A o anti-CD3 en combinación con IL-2). Se analizó la expresión del FasR a las 40 horas de cultivo objetivándose en todos los casos un aumento de expresión (Figura 5).



**Figura 5.** Expresión del FasR mediante citometría de flujo en células de bazo a las 40 horas de cultivo en presencia de anti-IgM (10  $\mu$ g/ml) o LPS (10  $\mu$ g/ml), o bien Con A (2  $\mu$ g/ml) o anti-CD3 (dilución 1:5000 de líquido ascítico) en combinación con IL-2 (10 U/ml). Se muestra la media de los resultados de la expresión del FasR de 4-6 ratones por cada cepa sustraído el valor del anticuerpo control. Se estudiaron ratones Balb/c y MRL/++ jóvenes (2 meses de edad para ambas cepas) y viejos (5 meses de edad para MRL/++ y 18 meses para Balb/c). En todos los casos se indujo un aumento en la expresión del FasR.

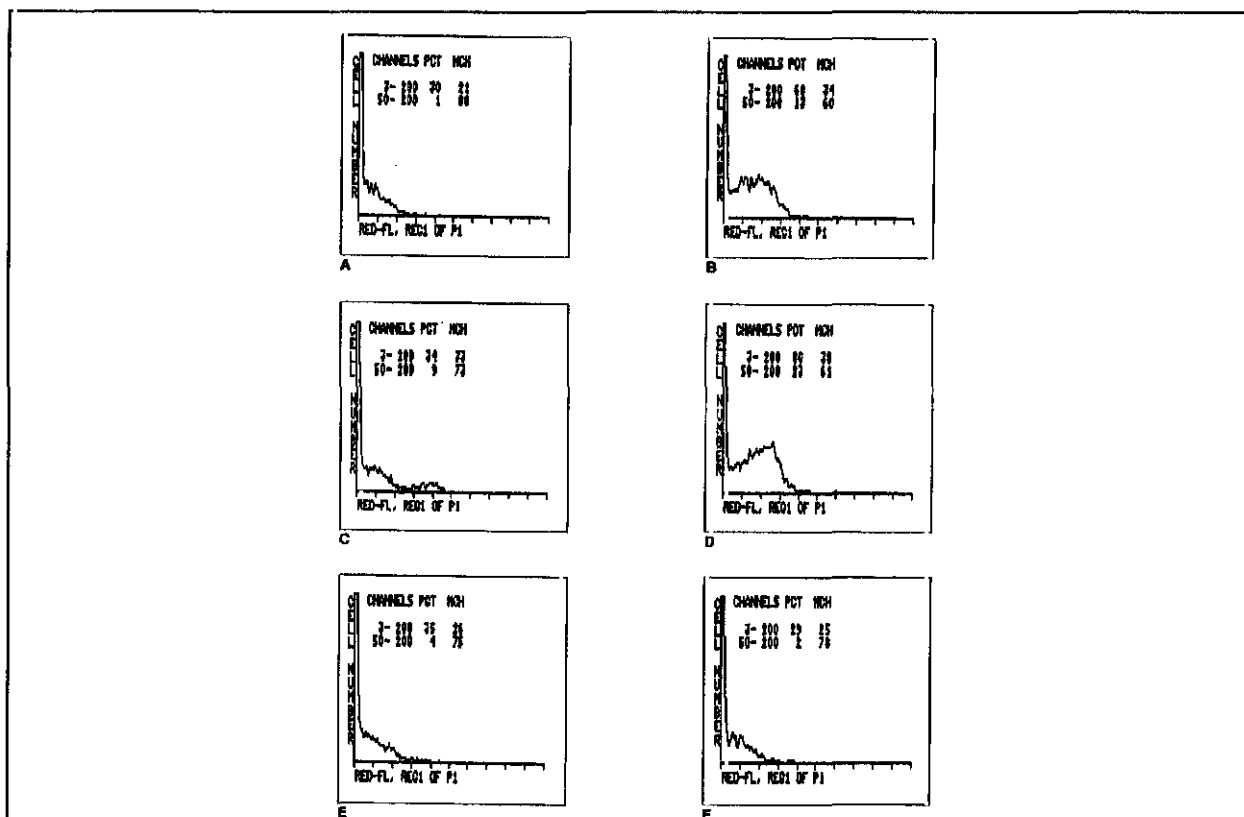
En todos los casos se comprobó que las células de bazo se encontraban activadas analizando mediante citometría de flujo la expresión del receptor de IL-2 (sobrenadante del hibridoma 7D4) y CD69 en el caso de estimulación con concanavalina A y anti-CD3 e IL-2. Y analizando la expresión del CMH de clase II e ICAM-1 en el caso de estimulación con LPS o anti-IgM. Para analizar el CMH de clase II se usaron los sobrenadantes de los hibridomas BP 107 (clase d) para Balb/c y TIB 93 (clase K) para MRL/++ (Tabla 1).

		Balb/c		MRL/++	
		Jóvenes	Viejos	Jóvenes	Viejos
Basal	CMH II	18±7	33±2	0±1	1±0
	ICAM-1	1±0	0±0	1±1	2±1
	IL-2R	4±2	4±2	0±0	0±0
	CD69	0±1	1±0	1±1	1±1
Anti-IgM	CMH II	62±12	89±12	50±10	65±14
	ICAM-1	27±5	35±8	30±5	31±3
LPS	CMH II	72±15	75±16	65±10	67±7
	ICAM-1	36±4	37±5	35±3	34±2
ConA	IL-2R	57±11	39±20	41±14	32±12
	CD69	70±12	68±17	42±5	32±10
Anti-CD3	IL-2R	48±2	38±18	36±15	45±12
	CD69	41±15	59±20	22±20	19±20

**Tabla 1.** Expresión de marcadores de activación de células T y B en células de bazo activadas con mitógenos mediante citometría de flujo. Se muestra la media de los resultados de la expresión de 4-6 ratones por cada cepa y grupo de edad sustraído el valor del anticuerpo control. En todos los casos se encontró activación celular.

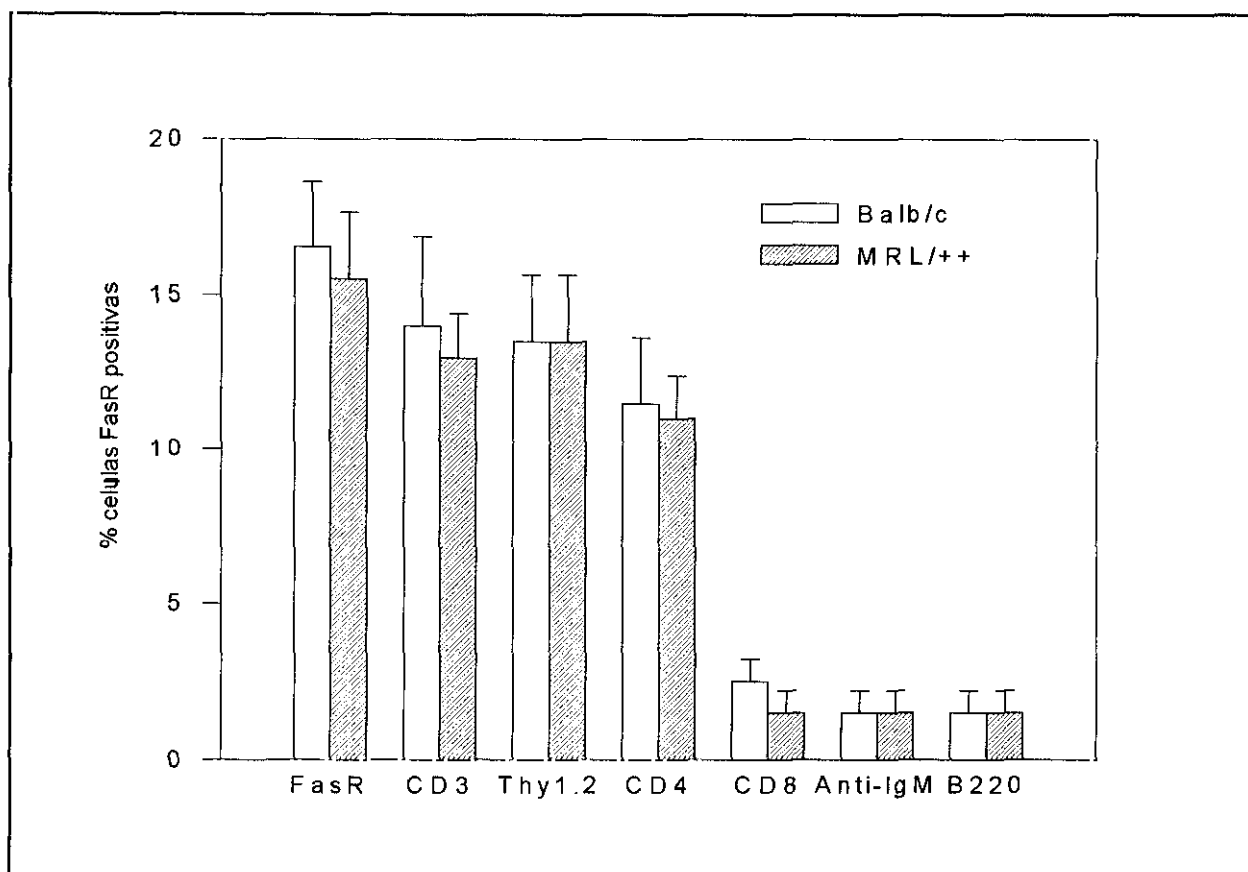
## 2. 1. 1. 5 EXPRESION DEL FASR EN CELULAS DE GANGLIOS LINFATICOS EN REPOSO

Se analizó la expresión del FasR en células frescas de ganglios linfáticos de 4-6 ratones por cada cepa estudiada de 4-6 semanas de edad mediante citometría de flujo utilizando el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo anti-FasR conejo anti-ratón<sup>199</sup>. Se detectó el FasR en un 17% de la población total de ganglios linfáticos de ratones Balb/c y MRL/++. En ratones MRL/lpr la expresión fue de un 2%, valor equivalente al del anticuerpo control IgG fragmento F(ab')<sub>2</sub> de conejo no inmunizado (Figura 6).



**Figura 6.** Expresión del FasR (B, D, F) o del anticuerpo control (A, C, E) en células frescas de ganglios linfáticos de ratones Balb/c (A, B), MRL/++ (C, D) y MRL/lpr (E, F) mediante citometría de flujo como se describió en la figura 1. Se muestran los resultados de ganglios linfáticos de un ratón representativo por cada cepa estudiada. La proteína FasR se detectó en un 17% de las células de ganglios linfáticos de las cepas Balb/c y MRL/++ (B, D) y en un 2% en la cepa MRL/lpr (F).

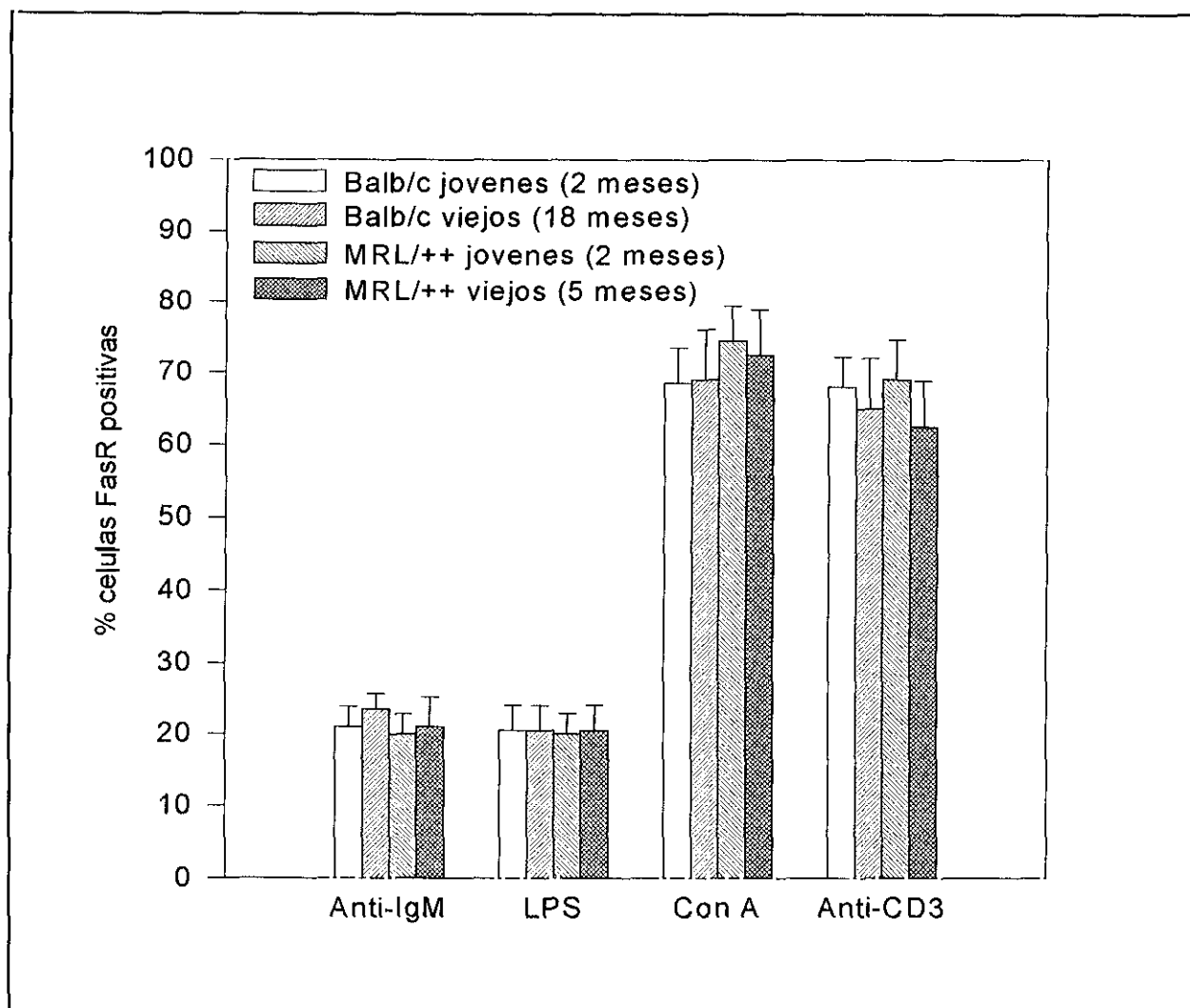
Se realizó doble tinción para el FasR y CD3, HO, CD4, CD8, IgM de superficie o B220, para analizar la expresión en células T CD3+, CD4+, CD8+ o B respectivamente en ratones Balb/c y MRL/++ de 4-6 semanas de edad. Se detectó que la expresión del FasR se debía fundamentalmente a las células CD4+ (Figura 7).



**Figura 7.** Expresión del FasR en las subpoblaciones de células frescas de ganglios linfáticos mediante doble tinción con citometría de flujo. Se muestra la media de los resultados de la expresión del FasR de 4-6 ratones por cada cepa estudiada sustraído el valor del anticuerpo control. Se obtuvo la máxima expresión del FasR en las células con marcadores T (CD3 y Thy 1.2), y dentro de éstas en la subpoblación CD4.

## 2. 1. 1. 6 EXPRESION DEL FASR EN CELULAS DE GANGLIOS LINFATICOS ESTIMULADAS

Para analizar si la expresión del FasR en células de ganglios linfáticos en reposo cambiaba al ser estimuladas, se incubaron las células de ratones Balb/c y MRL/++ con los mismos mitógenos descritos en las células de bazo. Se observó un aumento de expresión del FasR a las 40 horas de cultivo en todos los casos (Figura 8).



**Figura 8.** Expresión del FasR mediante citometría de flujo en células de ganglios linfáticos a las 40 horas de cultivo en presencia de anti-IgM (10  $\mu$ g/ml) o LPS (10  $\mu$ g/ml), o bien Con A (2  $\mu$ g/ml) o anti-CD3 (dilución 1:5000 de líquido ascítico) en combinación con IL-2 (10 U/ml). Se muestra la media de los resultados de la expresión del FasR de 4-6 ratones por cada cepa y grupo de edad estudiados sustraído el valor del anticuerpo control. En todos los casos se indujo un aumento en la expresión del FasR.



Se comprobó que las células de ganglios linfáticos se encontraban activadas analizando mediante citometría de flujo los marcadores de activación ya descritos en los experimentos en bazo (Tabla 2).

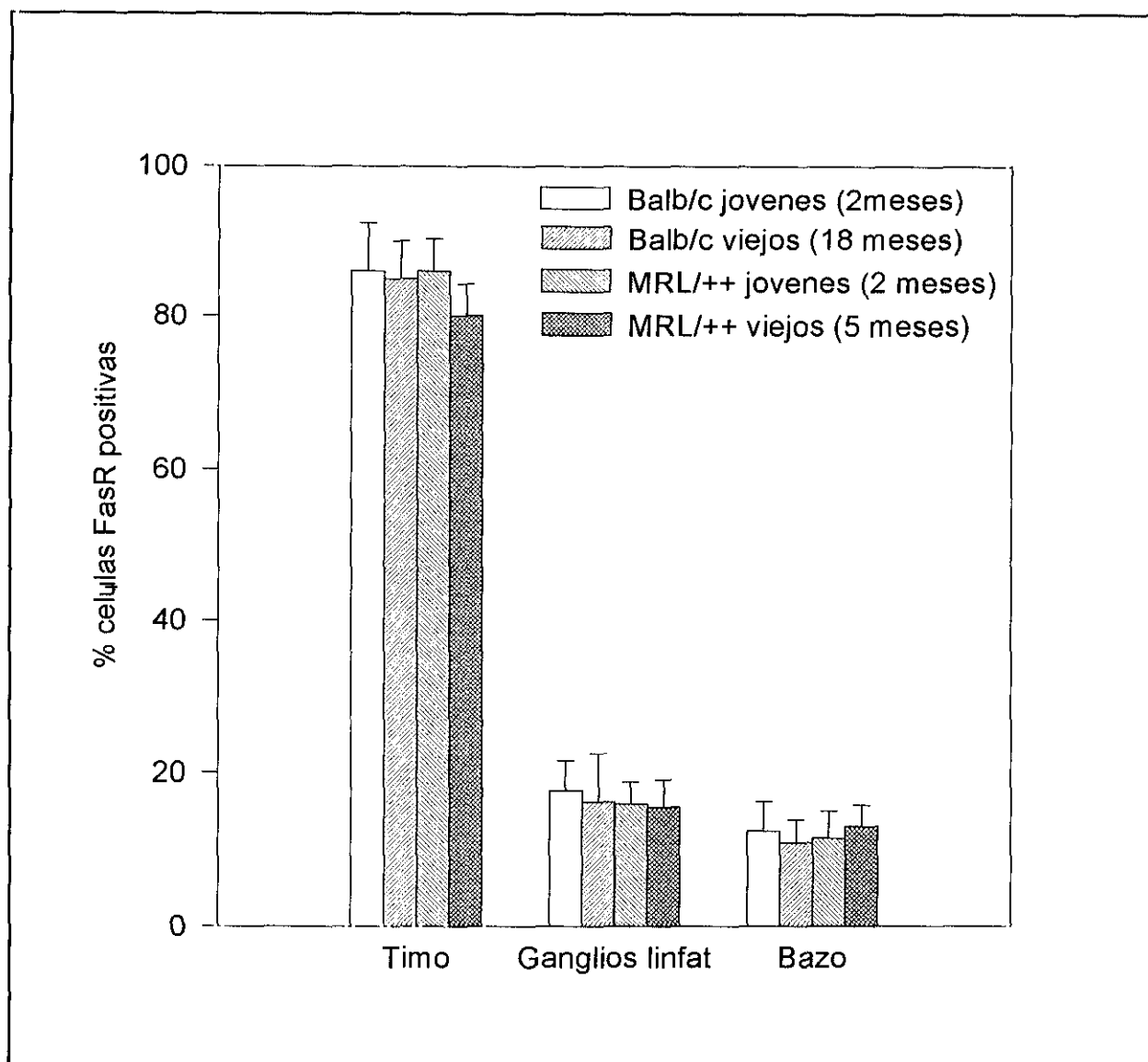
		Balb/c		MRL/++	
		Jóvenes	Viejos	Jóvenes	Viejos
Basal	CMH II	5±1	8±1	1±2	1±3
	ICAM-1	1±0	0±1	0±0	1±0
	IL-2R	7±0	6±1	2±2	1±2
	CD69	2±1	1±1	1±1	1±1
Anti-IgM	CMH II	59±3	65±5	60±4	62±4
	ICAM-1	8±2	16±2	10±1	15±2
LPS	CMH II	67±2	55±2	65±5	62±8
	ICAM-1	12±6	36±10	15±4	16±10
ConA	IL-2R	53±9	63±11	21±10	24±10
	CD69	78±15	84±20	48±5	46±5
Anti-CD3	IL-2R	42±6	54±13	17±10	24±10
	CD69	53±6	69±12	17±10	35±10

**Tabla 2.** Expresión de marcadores de activación de células T y B en células de ganglios linfáticos activadas con mitógenos mediante citometría de flujo. Se muestra la media de los resultados de la expresión de 4-6 ratones por cada cepa y grupo de edad estudiados sustraído el valor del anticuerpo control. En todos los casos se encontró activación celular.

## 2. 1. 1. 7 ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA EXPRESION DEL FASR A DISTINTAS EDADES

Se analizó si existían diferencias en la expresión del FasR entre cepas murinas normales y autoinmunes. También se analizó si existían diferencias en la expresión del FasR en relación a la edad entre ratones jóvenes antes del desarrollo del cuadro autoinmune y ratones viejos a una edad en la que el cuadro autoinmune ya estuviera instaurado. Para ello, se estudió la expresión del FasR mediante citometría de flujo en ratones Balb/c y MRL/++ a la edad de 2 meses para ambas cepas y a los 5 meses en MRL/++ y 18 meses en Balb/c. Se estudiaron células frescas procedentes de timo, bazo y ganglios linfáticos. Además, las células de bazo y ganglios linfáticos fueron analizadas tras estimulación con anti-IgM cabra anti-ratón, LPS, concanavalina A y anti-CD3 + IL-2 a las 40 horas de cultivo. Se estudiaron 4 ratones por cada cepa y grupo de edad.

No se encontró ninguna diferencia significativa en cuanto a la expresión del FasR al analizar células frescas de los distintos órganos linfoides en relación a la edad del ratón o la cepa murina (Figura 9). Cuando se analizaron células activadas con mitógenos a las 40 horas de cultivo, tampoco se encontró ninguna diferencia significativa al analizar los parámetros anteriores o entre los distintos mitógenos (Figuras 5 y 8). Se comprobó que las células se encontraban activadas analizando distintos marcadores de activación para células T y B mediante citometría de flujo (Tablas 1 y 2).



**Figura 9.** Expresión del FasR en células frescas de órganos linfoides mediante citometría de flujo. Se muestra la media de los resultados de la expresión del FasR de 4 ratones por cada cepa y grupo de edad estudiados sustraído el valor del anticuerpo control. La expresión del FasR no mostró una diferencia significativa en relación a la edad del ratón o la cepa murina estudiada.

## 2. 1. 2 ESTUDIOS HISTOLOGICOS DEL FASR EN RATONES

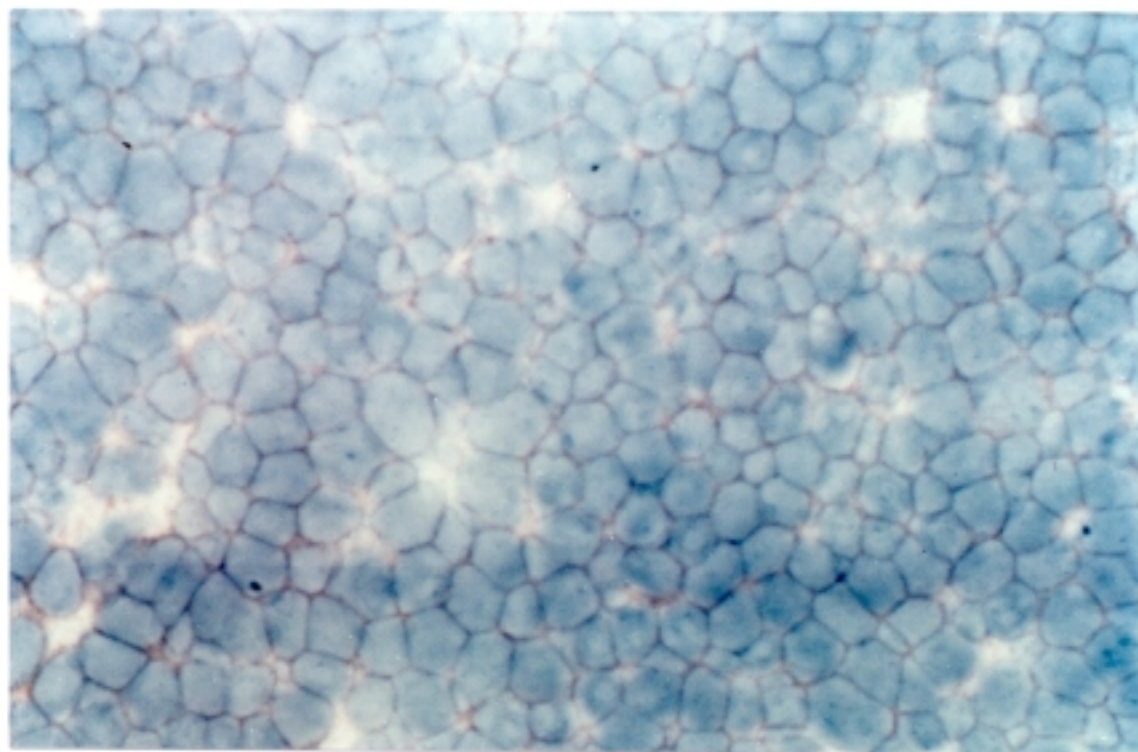
### 2. 1. 2. 1 EXPRESION DEL FASR MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA

Para examinar la distribución topográfica del FasR en tejidos murinos, realizamos análisis inmunohistoquímico en órganos linfoides y no linfoides en ratones Balb/c y MRL/lpr con el mismo anticuerpo anti-FasR<sup>199</sup> usado para los estudios de citometría de flujo.

En ratones Balb/c, se detectó el FasR sólo en órganos linfoides con un patrón de tinción en la membrana citoplasmática. A nivel de timo, el FasR se expresaba con una alta intensidad en casi todos los timocitos corticales y córtico-medulares y en células aisladas de la médula (Figura 10). En el bazo, el FasR se expresaba con una baja intensidad en escasas células alrededor del manguito periarteriolar, respetando los folículos y la pulpa roja (Figura 11). En los ganglios linfáticos, se encontró una expresión del FasR con una alta intensidad en los folículos y el manto (Figura 12).

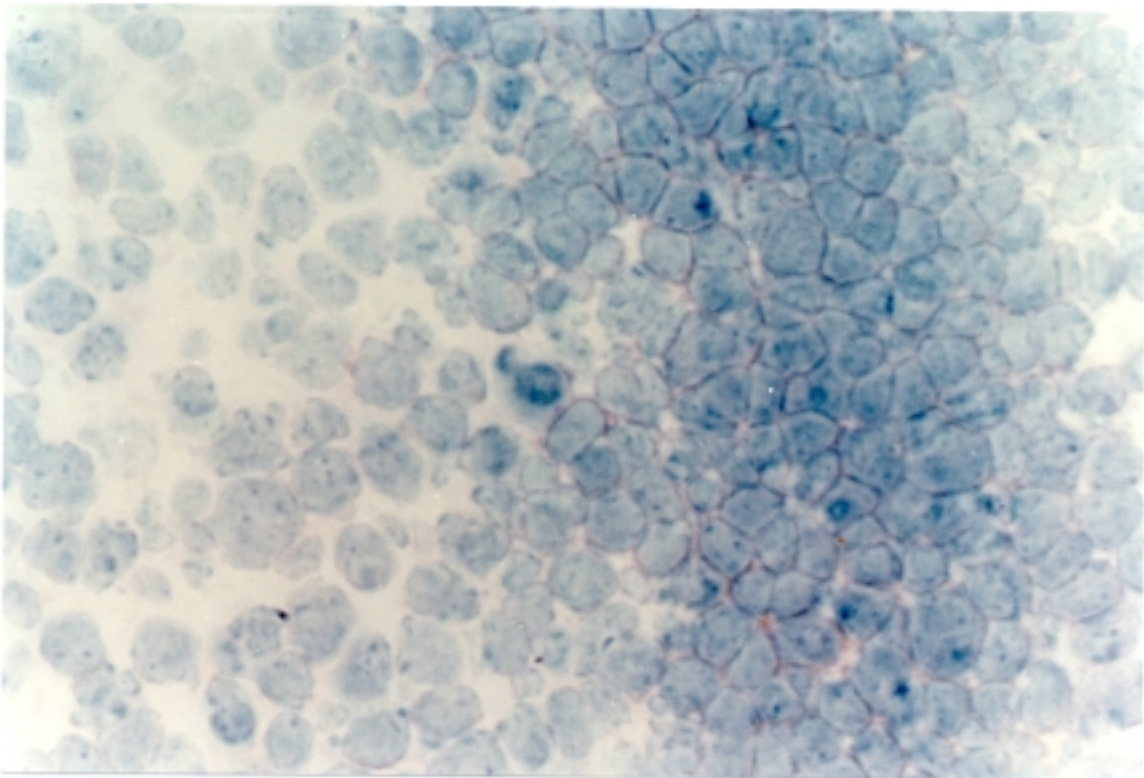
No se pudo objetivar una clara expresión del FasR comparado con el anticuerpo control en los órganos no linfoides estudiados de ratones Balb/c: cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, colon y ovarios.

Mediante IHC, el FasR no fue detectado en ninguno de los órganos estudiados en ratones MRL/lpr (Figura 10 D).

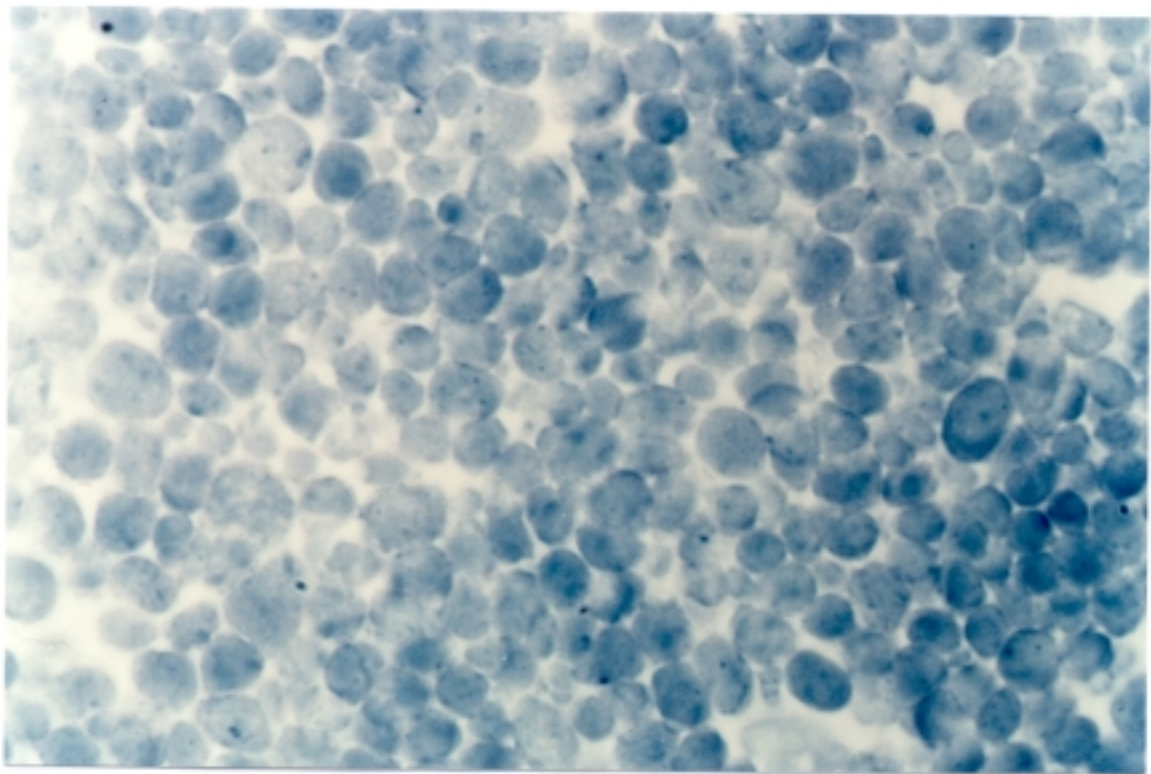


A

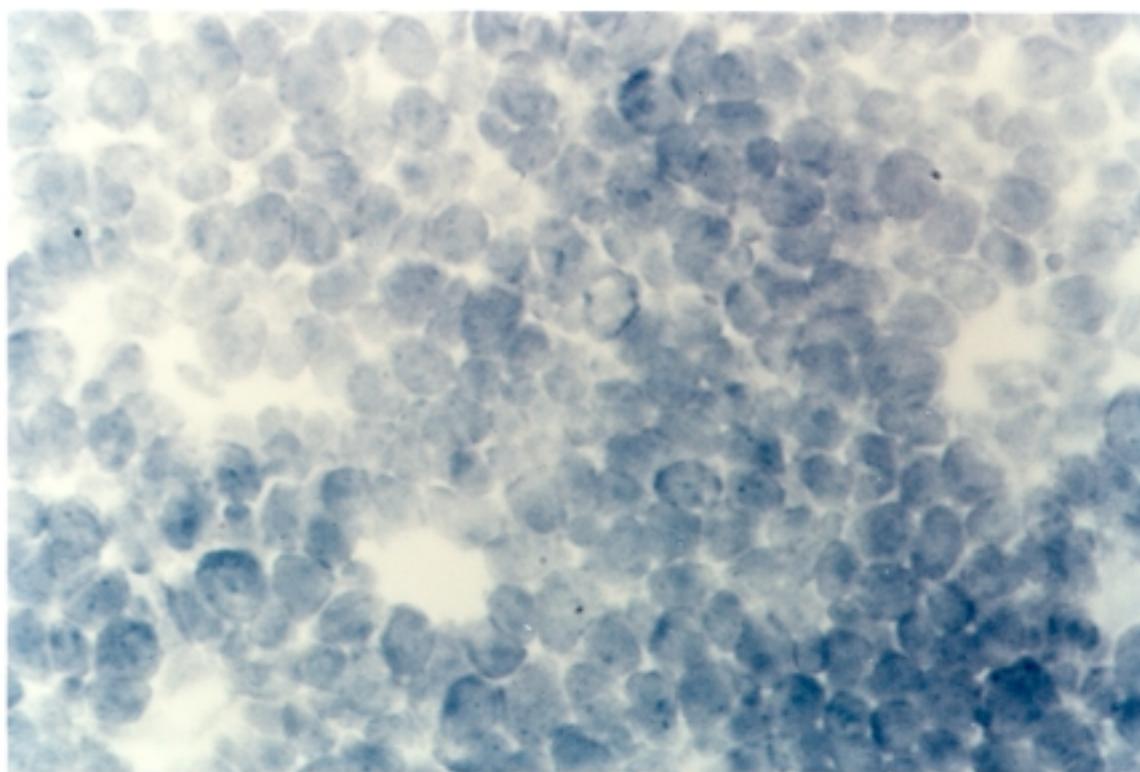
**Figura 10.** Expresión del FasR en timo. Los timos fueron obtenidos de ratones Balb/c (A, B, D) o MRL/lpr (C) de 6 semanas de edad y procesados mediante inmunoperoxidasa como se describió en métodos. Se usó como primer anticuerpo un anticuerpo policlonal conejo anti-ratón anti-FasR en A, B y C, mientras que se usó como control IgG normal de conejo no inmunizado en D. Todos los campos (x100) mostrados pertenecen a la corteza tímica, excepto B que muestra la unión córtico-medular.



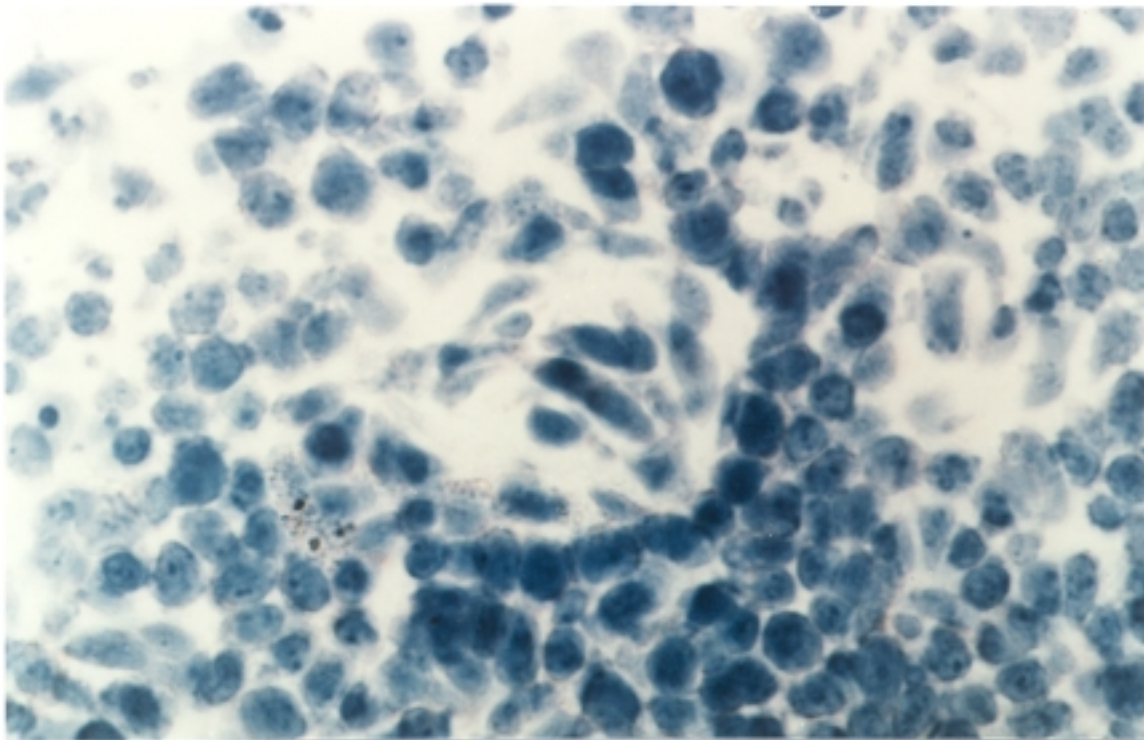
**B**



**C**

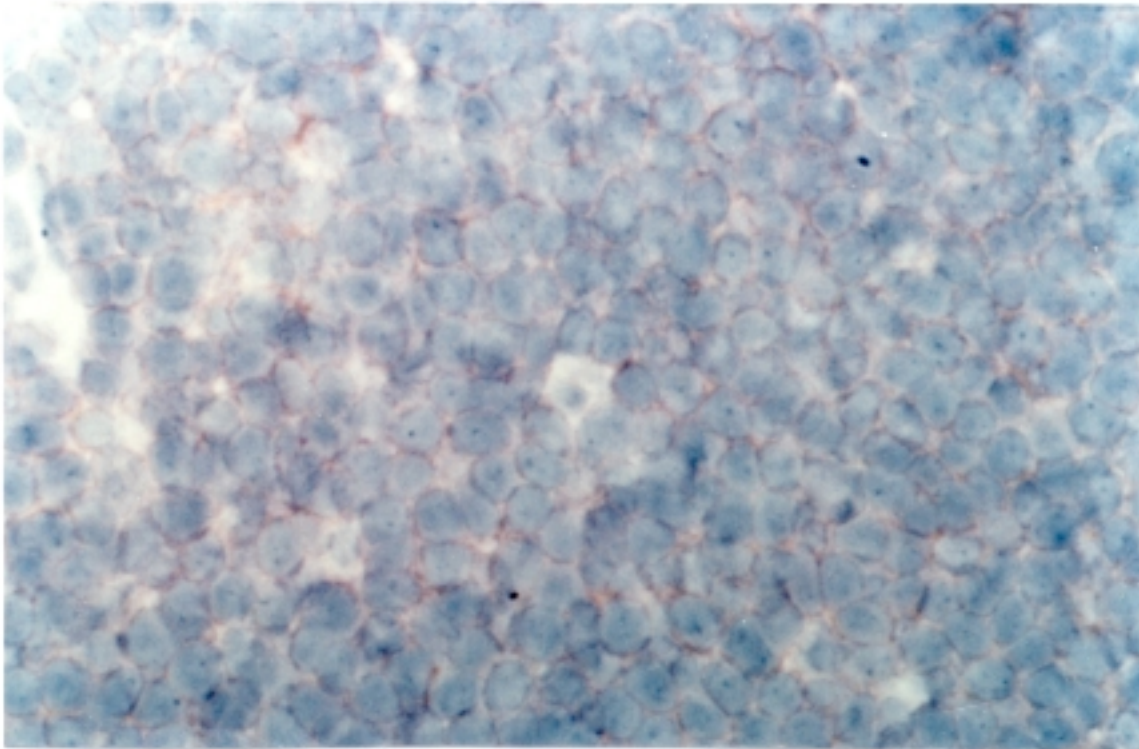


**D**



**Figura 11.** Expresión del FasR en bazo. Se analizó la expresión del FasR en el bazo de ratones Balb/c mediante inmunoperoxidasa como se describió en la figura 10. Se observaron bajos niveles de expresión del FasR sólo en células situadas alrededor del manguito periarteriolar. (x100).





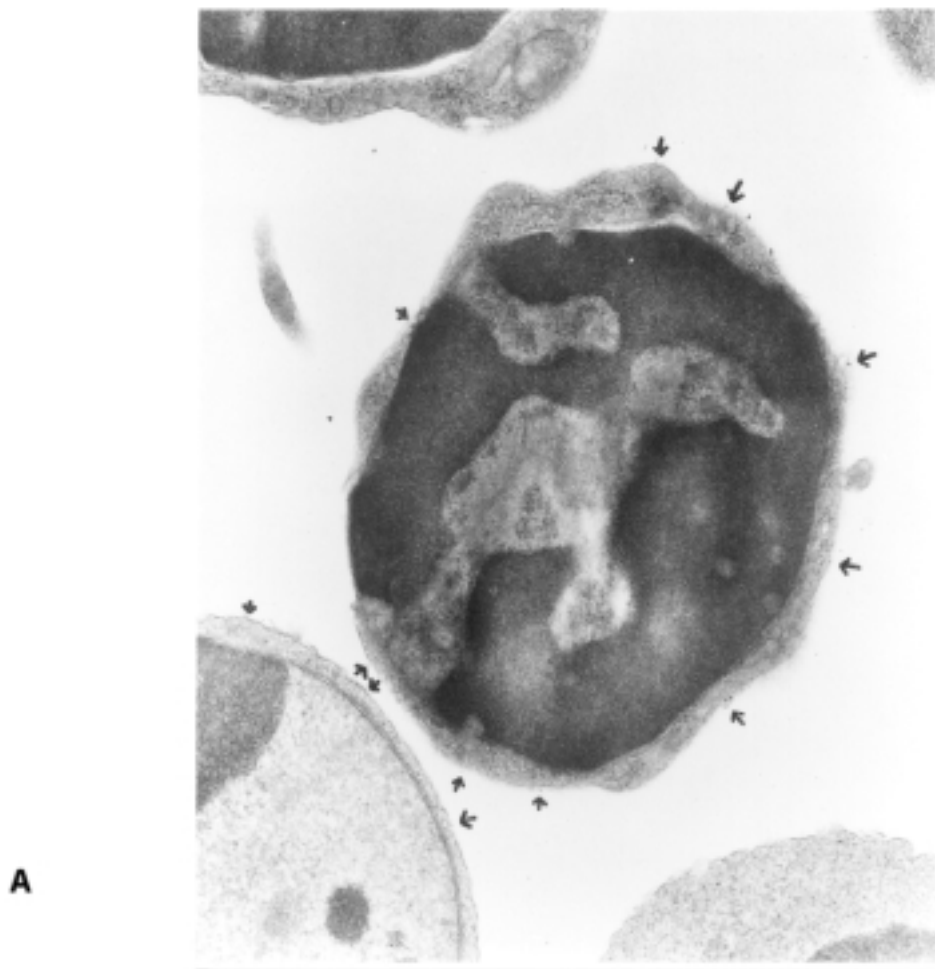
**Figura 12.** Expresión del FasR en ganglios linfáticos. Se analizó la expresión de FasR en ganglios linfáticos de ratones Balb/c mediante inmunoperoxidasa como se describió en la figura 10. La figura muestra linfocitos teñidos para el FasR en los folículos y manto. (x100).

## 2. 1. 2. 2 EXPRESION DEL FASR MEDIANTE INMUNO-MICROSCOPIA ELECTRONICA

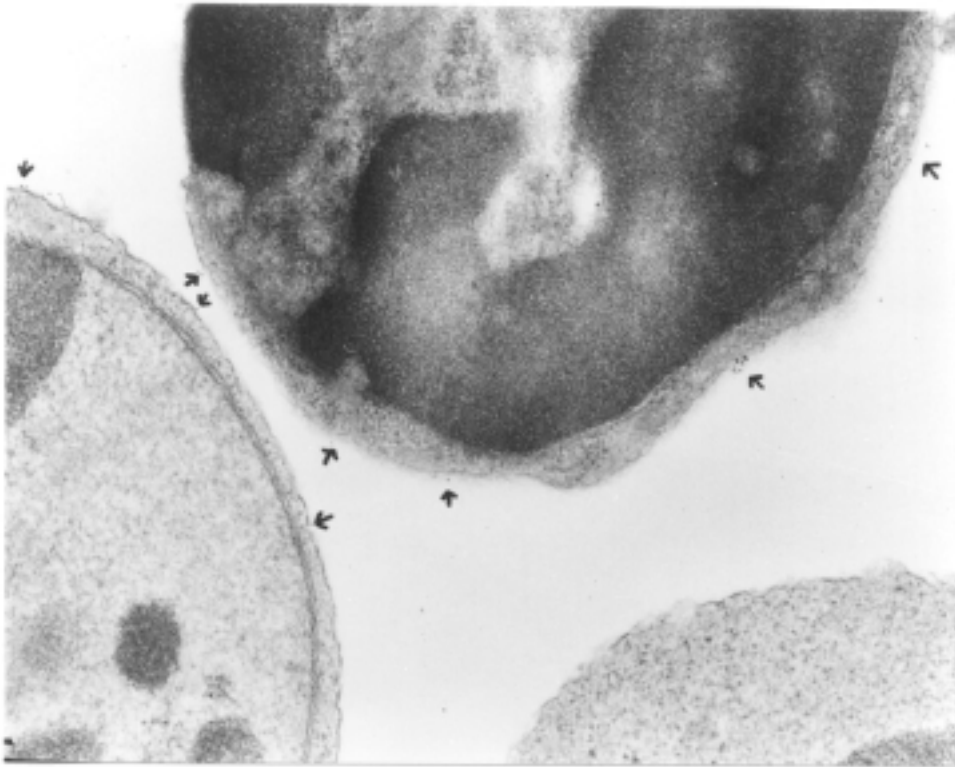
Los estudios de IME a nivel del timo de ratones Balb/c y MRL/++ con el mismo anticuerpo anti-FasR<sup>199</sup> usado para los estudios anteriores permitieron caracterizar mejor la distribución del FasR a nivel celular.

El FasR fue objetivado a nivel de la membrana celular de los timocitos. Se detectó una baja densidad de partículas de oro en ratones Balb/c. En ratones MRL/lpr también se observó alguna partícula de oro aislada en la membrana celular a una densidad de una partícula por cada 20 células, densidad considerablemente más baja que la observada en ratones Balb/c. En ambos casos la tinción se consideró específica puesto que no se observó ninguna partícula de oro en las muestras incubadas con el anticuerpo control o sin anticuerpo primario (Figura 13).

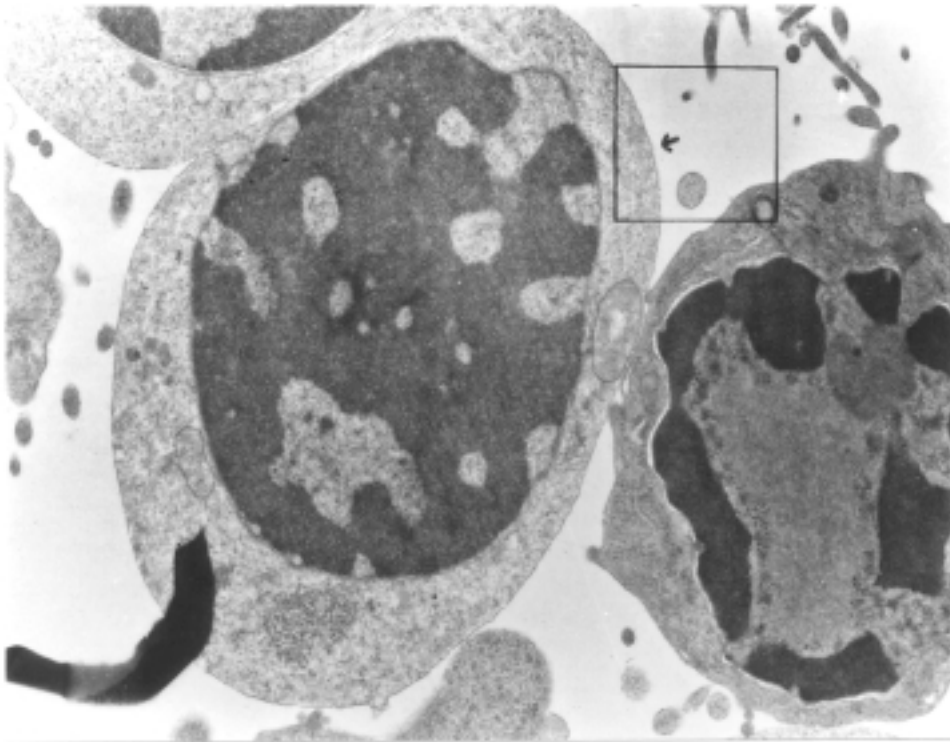
Curiosamente, los timocitos que expresaban el FasR mediante IME mostraban condensación cromatínica, hallazgo considerado como un marcador morfológico de apoptosis.



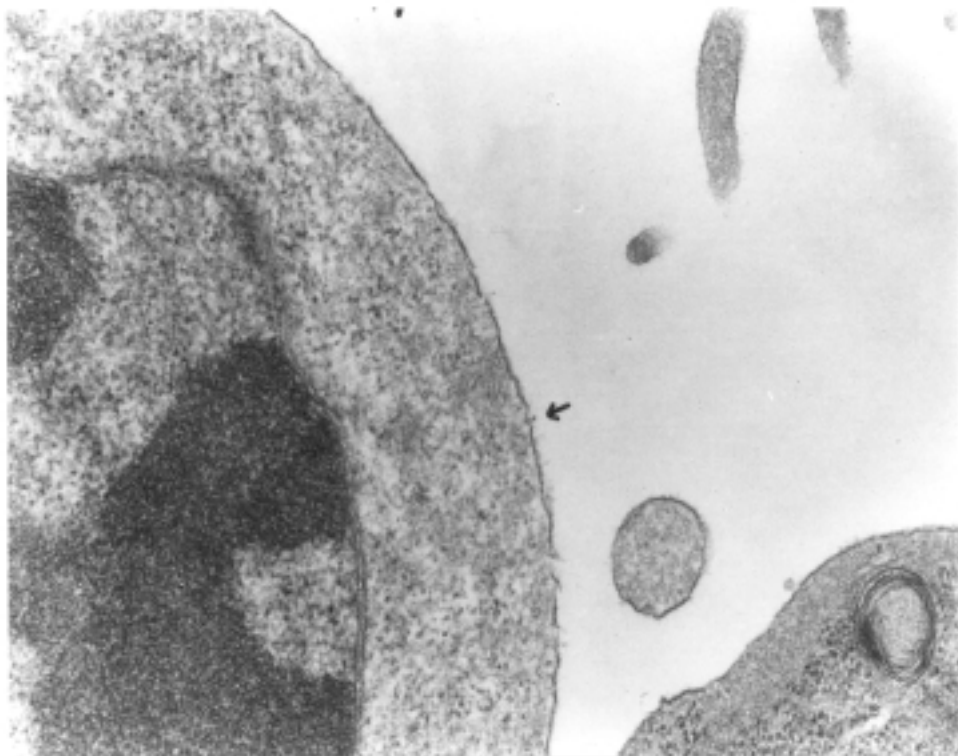
**Figura 13.** Expresión ultraestructural del FasR en timo. Los timocitos fueron obtenidos de ratones Balb/c (A y B) o MRL/lpr (C y D). Las muestras se procesaron para inmuno-microscopía electrónica como se describió en métodos y en todas las figuras se utilizó el anticuerpo anti-FasR. B y D son magnificaciones de un detalle de las figuras A y C respectivamente. Las flechas indican partículas de oro en la superficie de la membrana celular. Magnificaciones: 3A, x44000; 3B, x66000; 3C, x48000; 3D, x72000.



**B**



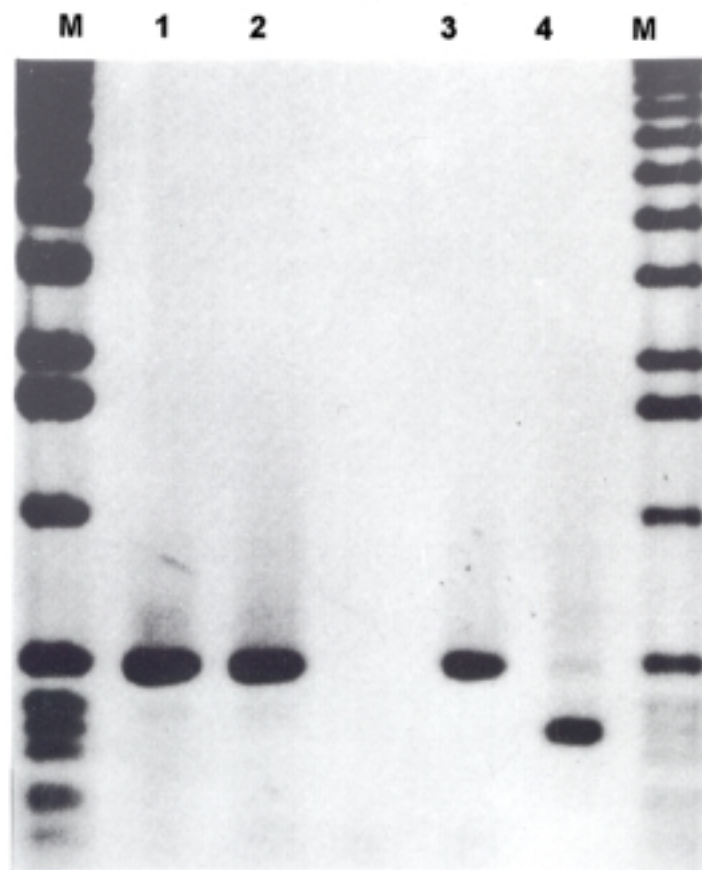
C



D

### 2. 1. 2. 3 ANALISIS DEL ARNm DEL FASR EN CORAZON E HIGADO DE BALB/C

Se analizó la expresión del ADNc del FasR en corazón e hígado de ratones Balb/c para descartar que la no detección del FasR mediante IHC en dichos órganos fuera debida a la posible existencia de formas truncadas del FasR. Se extrajo ARNm de dichos órganos y a partir de éste se obtuvo ADNc mediante transcriptasa inversa-RCP. No se encontró ninguna diferencia cuando se analizaron paralelamente muestras procedentes de corazón, bazo o hígado de ratones Balb/c, sin embargo sí se observó diferencia comparando con la línea celular 2PK3 en la cual se ha detectado una forma truncada del FasR<sup>200</sup>. De esto se dedujo que no era una forma truncada del FasR la responsable de que éste no fuera detectado mediante IHC en corazón e hígado de ratones Balb/c (Figura 14).



**Figura 14.** Expresión del ADNc del FasR en corazón e hígado de ratones Balb/c mediante transcriptasa inversa-RCP como se describió en métodos. Se observa que el ADNc de corazón e hígado de ratones Balb/c de 2 meses de edad (bandas 1 y 2) migra en la misma banda que el ADNc de bazo de ratones Balb/c de 4-5 meses (banda 3), mientras que la línea celular 2PK3 expresa un ADNc de menor peso molecular (banda 4). Los marcadores de peso molecular se muestran en la banda M.

## 2. 2 ESTUDIOS DEL FASL EN RATONES

### 2. 2. 1 ANALISIS DE LA EXPRESION DEL ARNm DEL FASL EN ORGANOS LINFOIDES

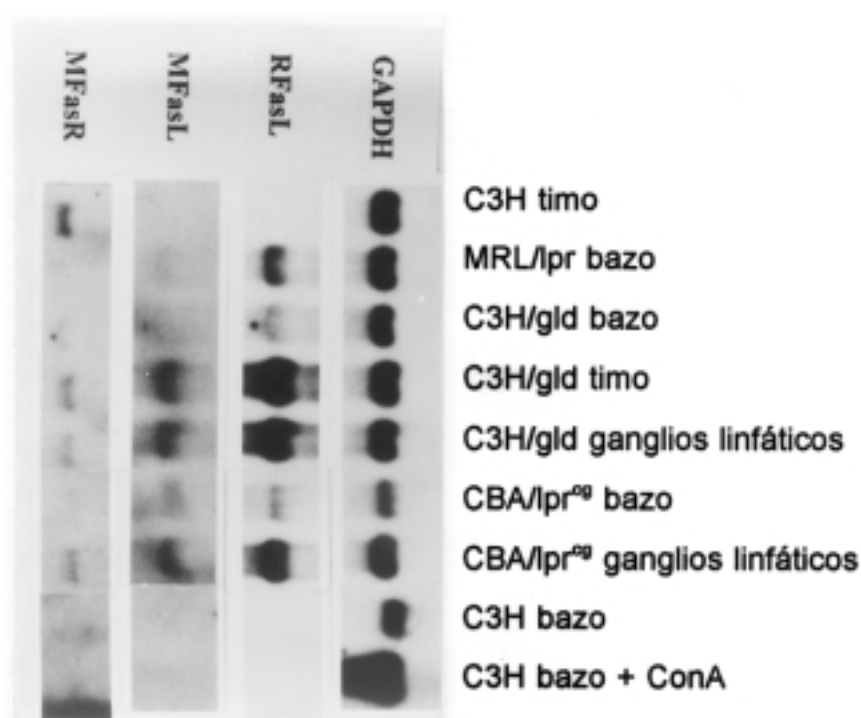
Se analizó la expresión del ARNm del FasL en timo y bazo de ratones normales C3H de 4-5 meses de edad mediante "northern blot" con sondas para el FasL de rata. Se encontró que la expresión del FasL era escasa o ausente, como ya había sido descrito previamente <sup>6</sup> (Figura 15). Estos resultados difieren de los encontrados para el FasR, cuyos niveles de expresión son modulados según el estado de maduración de los linfocitos, esto es, el FasR se expresa en un elevado porcentaje de células inmaduras (timo) pero su expresión es muy escasa en células maduras (bazo o ganglios linfáticos).

Por el contrario, se encontró una masiva expresión del FasL en timo, ganglios linfáticos y en menor grado en bazo de cepas de ratones con las mutaciones *lpr* (MRL/*lpr* y CBA/*lpr*<sup>cg</sup>) así como *gld* (C3H/*gld*) de 4-5 meses de edad (Figuras 15 y 16).

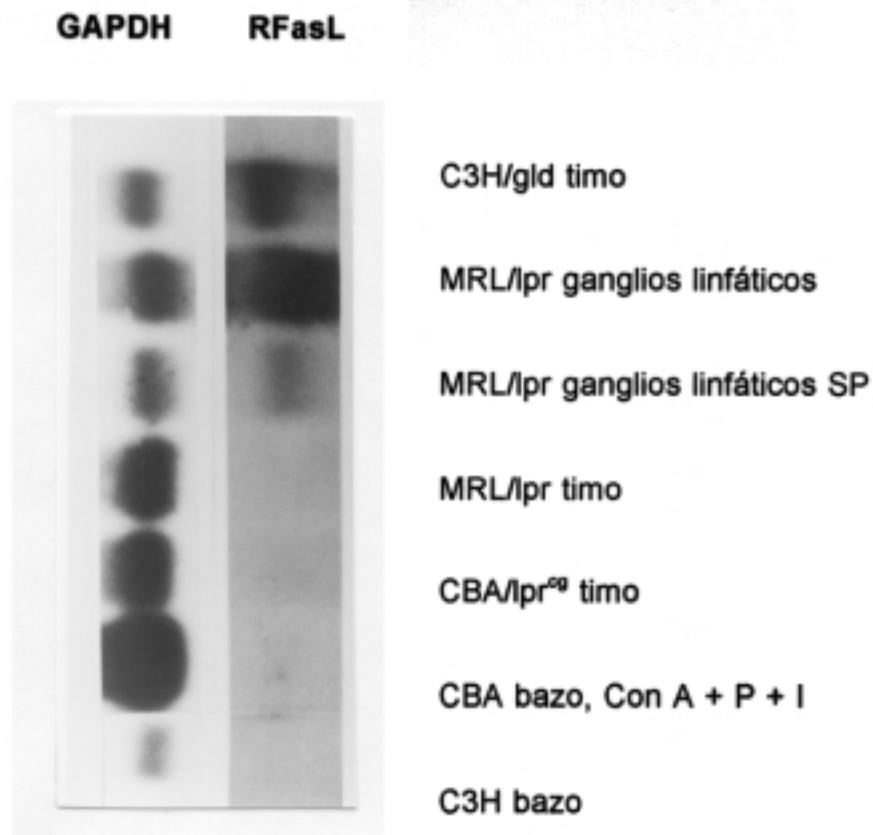


Previamente había sido descrito que la expresión del ARNm del FasL era escasa en células frescas de bazo de rata y de ratón y que su expresión era inducida tras activación con concanavalina A e IL-2 o PMA e ionomicina <sup>4,6</sup>. Además, el ADNc del FasL fue clonado a partir de células de bazo de ratón incubadas con concanavalina A e IL-2 durante 2 días seguido de PMA e ionomicina en las últimas 4 horas de cultivo <sup>6</sup>. Se analizó la expresión del ARNm del FasL mediante "northern blot" en células de bazo de ratones normales C3H de 4-5 meses cultivadas con concanavalina A e IL-2 durante 2 días así como de ratones CBA/++ de 3 meses cultivadas con concanavalina A e IL-2 durante 2 días al cabo de los cuales fueron re-estimuladas con PMA e ionomicina durante 4 horas. Se encontró que los niveles de expresión del ARNm del FasL eran 20 veces inferiores que los encontrados en los ratones con las mutaciones *lpr* y *gld* como se describió anteriormente (Figura 16).

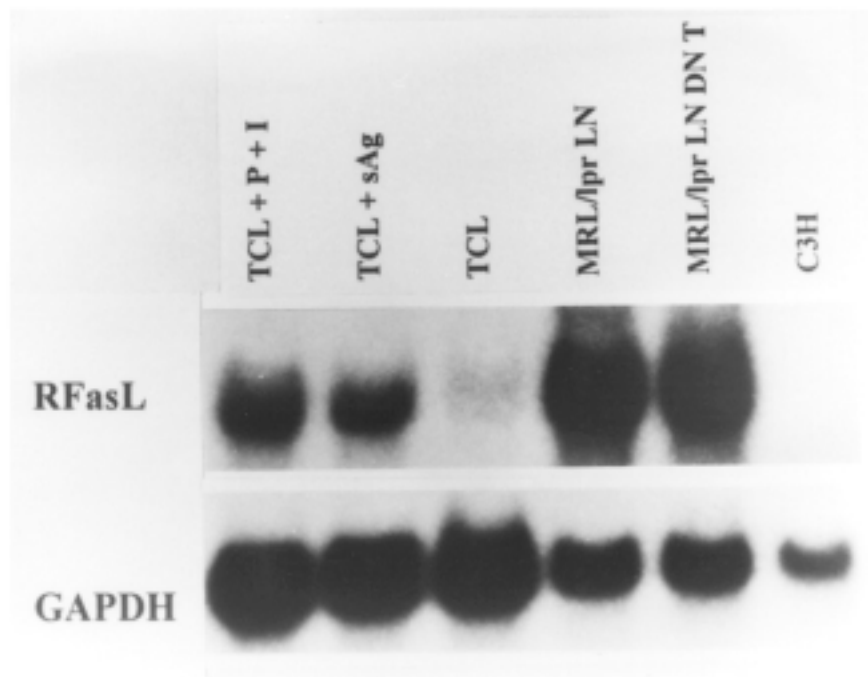
También se analizó la expresión del ARNm del FasL en una línea celular T TSST-1 reactiva >99% CD4+ obtenida de bazo de ratones MRL/++. La extracción del ARN se hizo en células que habían sido estimuladas 7 días antes con el superantígeno TSST-1 o 4 horas antes con PMA e ionomicina o TSST-1 en presencia de células irradiadas presentadoras de antígeno obtenidas de bazo. Se encontró que los niveles de expresión del FasL eran aproximadamente dos veces inferiores a los encontrados en los ganglios linfáticos de los ratones mutantes (Figura 17).



**Figura 15.** Expresión del ARNm del FasL y el FasR en timo, bazo y ganglios linfáticos de ratones C3H y ratones con las mutaciones *lpr*, *lpr<sup>og</sup>* y *gld* de 4-5 meses de edad mediante "northern blot" como se describió en métodos. Las membranas fueron sucesivamente hibridadas con sondas de ADNc de GAPDH, FasL de rata (RFasL), FasL de ratón (MFasL) y FasR de ratón (MFasR). Se observó una masiva expresión del FasL en timo y ganglios linfáticos y en menor grado en bazo de ratones mutantes. No se detectó expresión del FasL en timo ni en células de bazo frescas o estimuladas con concanavalina A (Con A) de ratones normales. La intensidad de expresión fue superior con la sonda del FasL de rata que con la de ratón porque la hibridación con la de rata fue previa a la de ratón. No se observó expresión del FasR en ratones *lpr*.



**Figura 16.** Expresión del ARNm del FasL a diferentes edades y en diferentes poblaciones celulares como se describió en la figura 15. La expresión del FasL en timo de ratones *lpr* y *lpr<sup>co</sup>* de 4 semanas fue casi indetectable comparada con la de timo de ratones *gld* de 4 meses. La expresión del FasL de células totales de ganglios linfáticos de ratones *lpr* de 4 meses fue muy superior a la de la subpoblación T CD4+ y CD8+ (SP) aislada de éstos. Se obtuvo ARNm de células de bazo de ratones normales (CBA) de 3 meses cultivadas con Con A + IL-2 durante 2 días seguido de re-estimulación con PMA e ionomicina en las últimas 4 horas de cultivo (Con A + P + I). La expresión del FasL fue casi indetectable comparada con la obtenida de ganglios linfáticos de ratones *lpr*.



**Figura 17.** Expresión del ARNm del FasL en diferentes tipos celulares. Se obtuvo ARNm de una línea celular CD4<sup>+</sup> TSST-1 reactiva obtenida de bazo de ratones MRL/++ como se describió en la figura 15. Las células habían sido estimuladas 7 días antes con TSST-1 (CTL) o 4 horas antes con PMA e ionomicina (CTL + P + I) o TSST-1 (CTL + sAg). La expresión del FasL fue considerablemente inferior a la observada en ganglios linfáticos (LN) de ratones lpr de 4 meses. La expresión del FasL de células totales de ganglios linfáticos (LN) de ratones lpr de 4 meses fue similar a la de la subpoblación T doble negativa (LN DN T) aislada de éstos.

## 2. 2. 2 ANALISIS DE LA EXPRESION DEL ARNm DEL FASL EN GANGLIOS LINFATICOS

Los ratones adultos (4-5 meses) de las cepas con las mutaciones *lpr* y *gld* presentan un considerable aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, ocupados en un 90% por células con el fenotipo de dobles negativas (CD4-CD8-). Como habíamos encontrado una hiperexpresión del FasL en los ganglios linfáticos de estas cepas y las células dobles negativas (DN) son la población predominante, se analizó separadamente la expresión en células DN y positivas sólo para CD4 o CD8 (SP) de ratones MRL/*lpr* de 4 meses de edad.

Tras separación de las células DN y SP mediante selección negativa, la pureza de la población mediante citometría de flujo fue de un 80-96%.

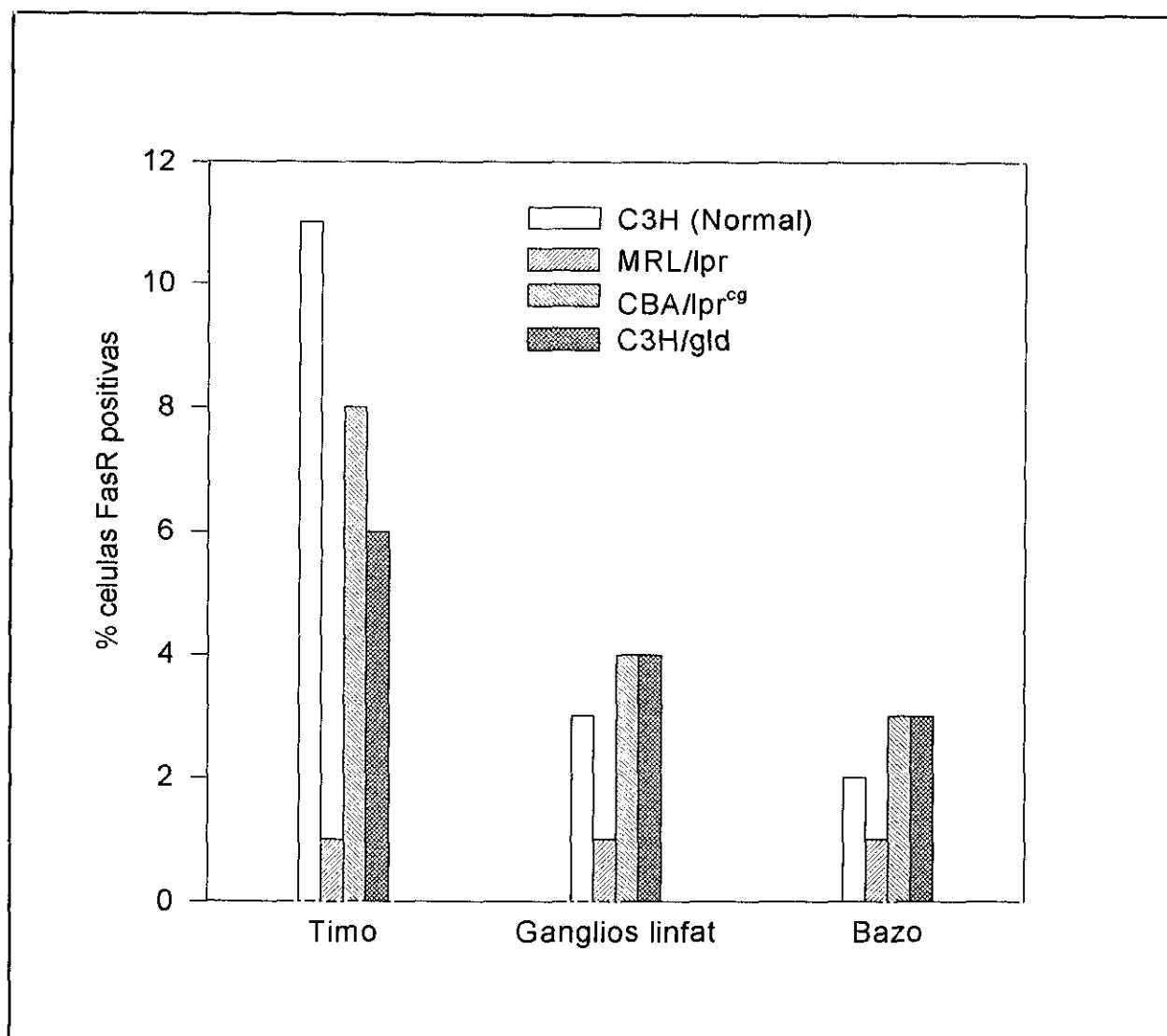
Se realizó "northern blot" con la sonda del FasL de rata en poblaciones celulares DN o SP con una pureza superior al 95%. Se encontró que la expresión del FasL comparada con la de la población total era similar y la mitad en las poblaciones DN y SP respectivamente (Figuras 16 y 17).

### 2. 2. 3 ANALISIS DE LA REGULACION DE LA EXPRESION DEL ARNm DEL FASL Y EL FASR

Se ha postulado que el FasR y el FasL son una pareja de moléculas que se regulan recíprocamente <sup>220</sup>. Este modelo de regulación es compatible con la elevada expresión del FasL observada en los ratones MRL/lpr, ya que éstos expresan escasa o ninguna proteína FasR. Por este motivo sospechábamos que la expresión del FasL estaría elevada no sólo en los ratones lpr viejos como habíamos observado, sino también en los jóvenes. Para ello se realizó "northern blot" con la sonda del FasL de rata en timo de ratones MRL/lpr y CBA/lpr<sup>cg</sup> de 4 semanas de edad. Se observó una expresión casi indetectable (Figura 16).

Por otra parte, como ya se ha descrito, la elevada expresión del FasL fue similar en ratones de 4 meses con las mutaciones lpr y gld, éstos últimos expresaban el FasR y un FasL mutado <sup>6</sup>.

Para analizar si existía una correlación entre la expresión del FasR y el FasL, se rehibridaron las membranas con la sonda del FasR. Como esperábamos, la expresión del ARNm del FasR en MRL/lpr fue muy escasa. A diferencia de la elevada expresión del FasL observada en los órganos linfoides de ratones lpr y gld viejos, no se observó un incremento en la expresión del FasR en los ratones viejos. Además, la expresión del FasR en C3H/gld no fue superior a la observada en ratones normales C3H o MRL/lpr<sup>o9</sup>. Estos datos sugieren que el FasR y el FasL no siguen un patrón de regulación recíproca en ratones lpr y gld (Figura 18).

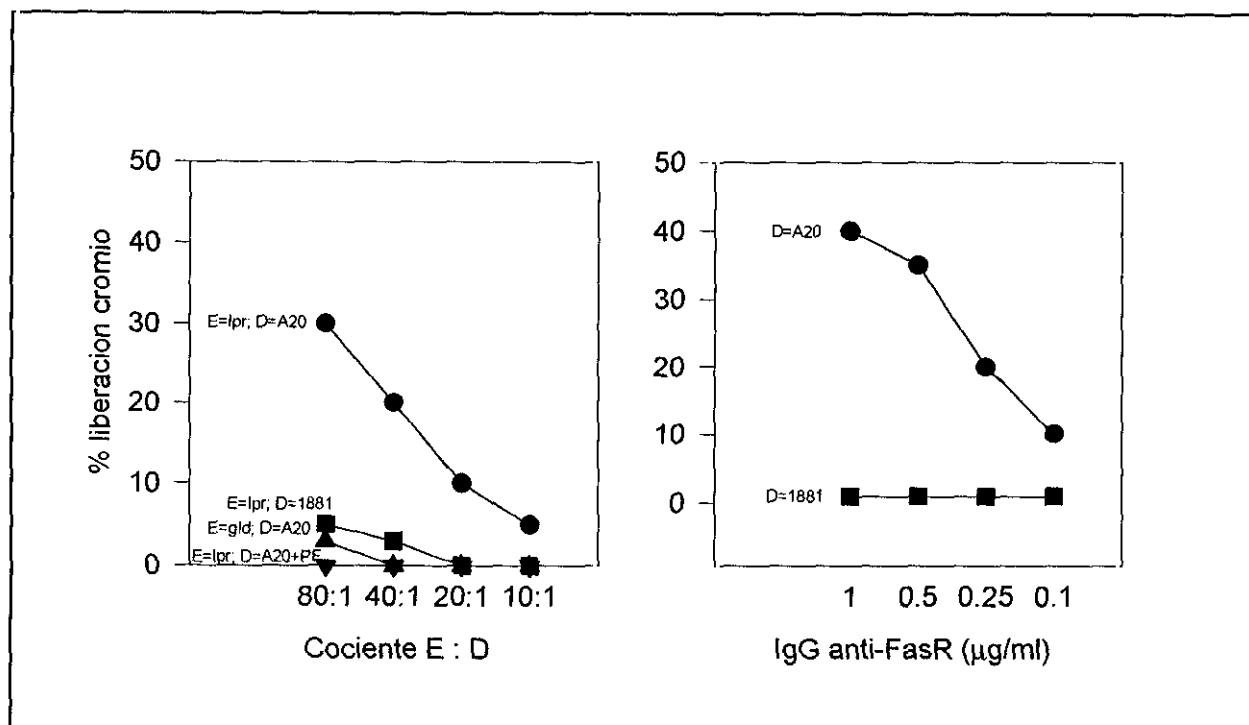


**Figura 18.** Niveles de expresión del ARNm del FasR. Se obtuvo ARNm de timo, bazo y ganglios linfáticos de ratones de 4-5 meses de edad como se describió en métodos. Los niveles de expresión fueron expresados como FasR/GAPDH x 100. No se observó expresión del FasR en ratones lpr. La expresión del FasR de ratones gld no fue superior a la observada en ratones lpr<sup>cg</sup> y ratones normales.



## 2. 2. 4 CITOTOXICIDAD DE CELULAS DE GANGLIOS LINFATICOS DE RATONES lpr

Como habíamos observado que las células de ganglios linfáticos de ratones lpr hiperexpresaban el FasL, se realizó un estudio funcional de liberación de cromo 51 para determinar si tenían la capacidad de matar células que expresaban un alto porcentaje del FasR. Como células efectoras, se utilizaron células totales frescas de ganglios linfáticos de ratones MRL/lpr<sup>cg</sup> y C3H/gld de 4 meses de edad. Como células diana se usaron las líneas celulares A20 (FasR+) y 1881 (FasR-)<sup>200</sup> marcadas con cromo 51. Tras 4-6 horas de co-incubación, se observó que las células lpr inducían la muerte de la línea celular A20 pero no de la línea celular 1881 de forma dosis-dependiente. Por el contrario, los ratones gld, que expresan un FasL mutado, no indujeron la muerte de la línea celular A20 (Figura 19 A). Para inhibir la inducción de muerte celular, las células de ganglios linfáticos de ratones lpr fueron preincubadas con una proteína de fusión producida entre la fracción constante de la IgG humana y la porción extracitoplásmica del receptor del FasR (cedida por el Dr. S-T Ju, Boston University, MA). Esta proteína simula a un FasR soluble y por tanto ocupa los sitios de unión del FasL. Cuando se realizó esta preincubación no se observó inducción de muerte celular de la línea celular A20 (Figura 19 A). Para confirmar nuestros resultados, se incubaron las líneas celulares con un agonista del FasL, el anticuerpo anti-FasR Jo2<sup>170</sup>. Se observó una inducción de muerte celular selectiva y dosis-dependiente de la línea celular A20 pero no de la 1881. Estos resultados sugieren que la inducción de muerte celular está mediada exclusivamente a través del FasR (Figura 19 B).



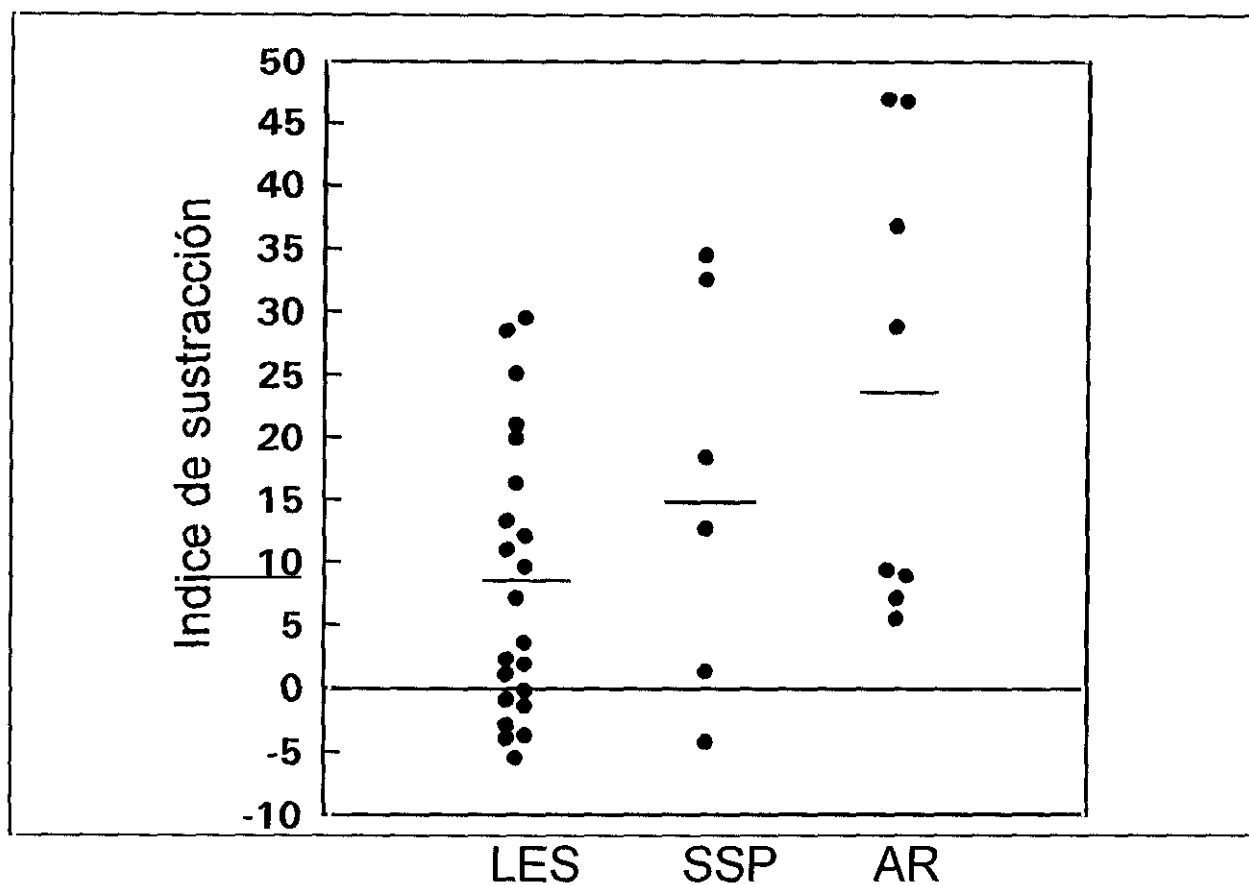
**Figura 19.** Actividad citotóxica de las células de ganglios linfáticos de ratones lpr y gld. Se utilizaron como efectoras (E) células totales frescas de ganglios linfáticos de ratones lpr<sup>og</sup> y gld de 4 meses de edad. Como diana (D) se usaron las líneas celulares B A20 (FasR +) y 1881 (FasR -) marcadas con cromo 51. Tras 4-6 horas de co-incubación, se observó que las células lpr inducían la muerte de la línea A20 pero no de la 1881 de forma dosis-dependiente. Las células gld no inducían la muerte de ninguna de las dos líneas. La proteína de fusión IgG-FasR (PF), que simula a un FasR soluble y bloquea al FasL, fue capaz de inhibir la capacidad citolítica de las células lpr sobre la línea A20. Un agonista del FasL, el anticuerpo anti-FasR Jo2, indujo la muerte selectiva y dosis-dependiente de la línea A20 pero no de la línea 1881.

## 2. 3 ESTUDIOS DEL RECEPTOR APO-1 EN HUMANOS

### 2. 3. 1 EXPRESION DE APO-1 EN CMSP FRESCAS

Se determinó la expresión de APO-1 en células mononucleares frescas de sangre periférica de pacientes con LES, AR, SSP y controles sanos mediante citometría de flujo utilizando anti-APO-1 IgG1 ratón anti-humano <sup>2</sup>. Cuando se comparó directamente, el porcentaje de células que expresaban APO-1 era superior en los pacientes con LES (media±DE = 34±17%) en relación a los controles sanos (25±13%) (p< 0.001).

Para minimizar variaciones en los resultados de citometría de flujo entre experimentos realizados en distintos días, se expresó el porcentaje de células que expresaban APO-1 en la población de pacientes como un índice de sustracción: expresión de APO-1 en las células de los pacientes - expresión de APO-1 en las células de los controles sanos. Con este índice, se encontró que el porcentaje de células que expresaban APO-1 era significativamente superior en pacientes con LES (9±11%) comparado con los controles sanos (por definición 0) (p< 0.001). También se encontró una expresión de APO-1 más elevada en pacientes con AR (p< 0.01) y SSP (p= 0.05) comparados con controles sanos, aunque la diferencia entre pacientes con SSP y controles estaba en el límite, presumiblemente porque el tamaño muestral en este subgrupo era escaso (Figura 20).

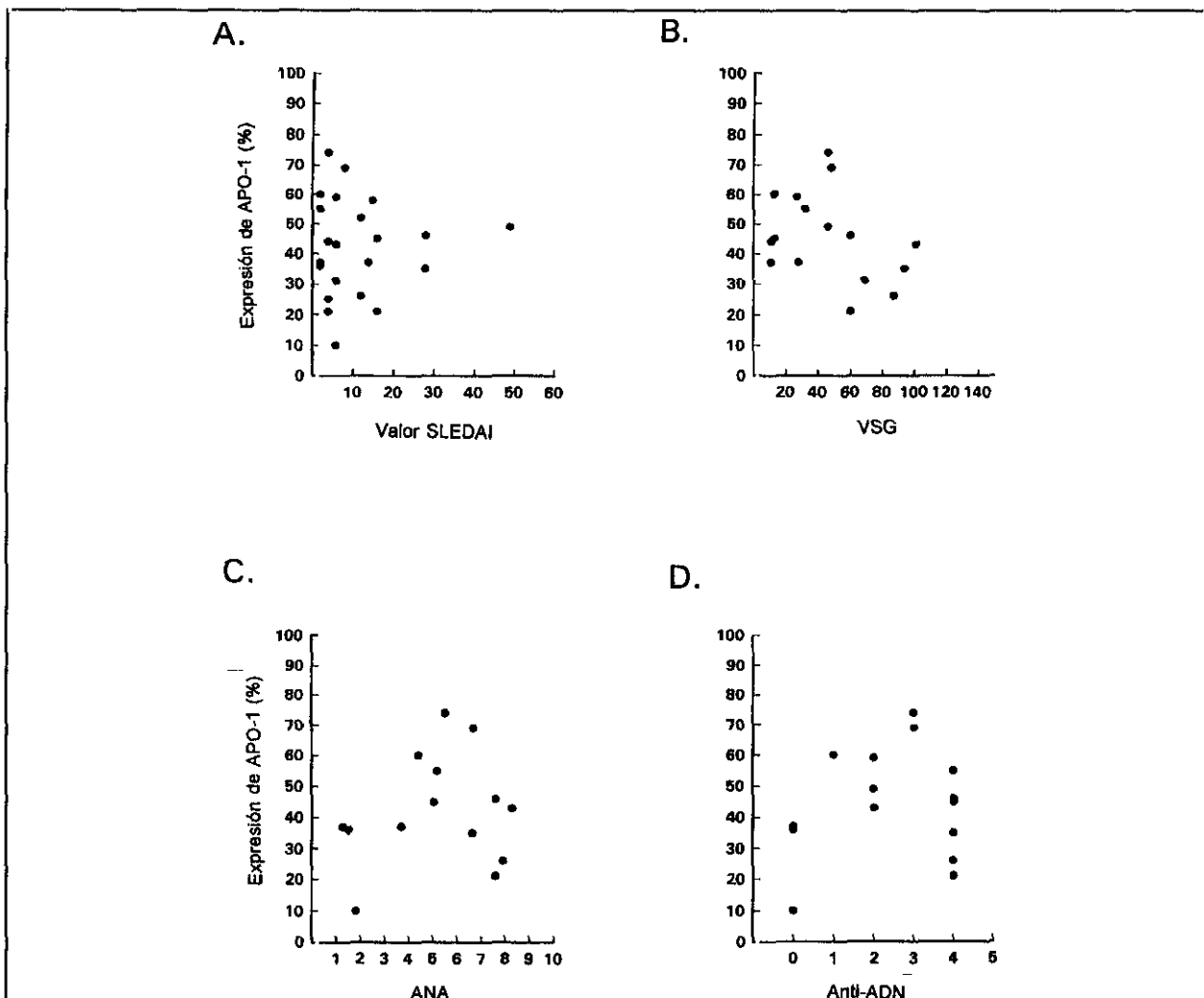


**Figura 20.** Expresión de APO-1 en células mononucleares frescas de sangre periférica. Se analizó mediante citometría de flujo la expresión de APO-1 en células de pacientes con LES, SSP y AR. Los resultados están expresados como el índice de sustracción = expresión de APO-1 en pacientes - expresión de APO-1 en controles sanos. Los niveles de expresión de APO-1 en pacientes con LES y AR fue significativamente superior ( $p < 0.001$  y  $p < 0.01$  respectivamente) y en los pacientes con SSP estuvo en el límite ( $p < 0.05$ ) al ser comparados con los controles sanos.

---

## 2. 3. 2 CORRELACION ENTRE LA EXPRESION DE APO-1 CON MARCADORES CLINICOS Y ANALITICOS DE ACTIVIDAD DEL LES

Como se había demostrado que la expresión de APO-1 estaba incrementada en linfocitos activados, se analizó la correlación entre el porcentaje de expresión de APO-1 en pacientes con LES y parámetros clínicos y serológicos de actividad de la enfermedad. Se examinó el índice clínico SLEDAI<sup>208</sup> y los parámetros serológicos de VSG, ANA y anticuerpos anti-ADN nativo. No existía correlación significativa entre la expresión de APO-1 y ninguno de los parámetros clínicos o serológicos de actividad de la enfermedad analizados ( $p > 0.05$  en todos los casos) (Figura 21).



**Figura 21.** Relación entre la expresión de APO-1 y marcadores de actividad de la enfermedad en el LES. Se correlacionó la expresión de APO-1 en células de sangre periférica de pacientes con LES con el índice SLEDAI (A), así como con parámetros serológicos: VSG (B), ANA (C) y anti-ADN nativo (D). No se encontró una asociación significativa entre la expresión de APO-1 y ninguno de estos parámetros ( $p > 0.05$ ).

### 2. 3. 3 EXPRESION DE APO-1 EN LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS

Se analizó qué población de linfocitos era la responsable del aumento de la expresión de APO-1 en pacientes con LES mediante doble tinción de citometría de flujo para APO-1 y anticuerpos monoclonales específicos para células T (anti-CD3) y células B (anti-CD19). Mediante análisis de estos anticuerpos, se encontró que la expresión de APO-1 en pacientes con LES era superior en células T ( $46\pm 14\%$ ) comparado con células B ( $22\pm 12\%$ ) ( $p < 0.05$ ). También se encontró que el porcentaje de expresión de APO-1 en células T y B era significativamente mayor en pacientes con LES comparados con controles sanos ( $28\pm 7\%$  para células T y  $10\pm 3\%$  para células B,  $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

### 2. 3. 4 EXPRESION DE APO-1 EN LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T

Se analizó qué subpoblación de linfocitos T era la responsable del aumento de la expresión de APO-1 en pacientes con LES mediante doble tinción de citometría de flujo para APO-1 y anticuerpos monoclonales específicos para los receptores de superficie CD4 o CD8. Mediante análisis de estos anticuerpos, se encontró que APO-1 se expresaba en mayor porcentaje tanto en linfocitos T CD4+ ( $57\pm 18\%$ ) como CD8+ ( $54\pm 22\%$ ) de pacientes con LES comparados con controles sanos ( $38\pm 8\%$  para CD4+ y  $24\pm 7\%$  para CD8+). También se observó que la expresión de APO-1 era relativamente superior en la subpoblación de linfocitos T CD8+ comparados con los CD4+ (2.2 veces mayor en los pacientes con LES y 1.5 veces mayor en los controles).

Se realizó doble tinción de citometría de flujo para APO-1 y anticuerpos monoclonales específicos para los receptores de superficie CD29 y CD45RA para analizar si la población de linfocitos T que expresaban APO-1 presentaban un fenotipo de células activadas o nativas respectivamente. Se encontró que la mayoría de las células T de pacientes con LES que expresaban APO-1 también expresaban el marcador de activación celular CD29 ( $88\pm 10\%$  para CD29 y  $21\pm 10\%$  para CD45RA) (Tabla 3).

	CD3	CD19	CD4	CD8	CD29	CD45RA
Normal	$28\pm 7^*$	$10\pm 3^*$	$38\pm 8^*$	$24\pm 7^\ddagger$	$72\pm 21$	$26\pm 21$
<i>n</i>	5	7	8	8	7	7
LES	$46\pm 14^*$	$22\pm 12^*$	$57\pm 18^*$	$54\pm 22^\ddagger$	$88\pm 10$	$21\pm 10$
<i>n</i>	11	7	8	8	5	5

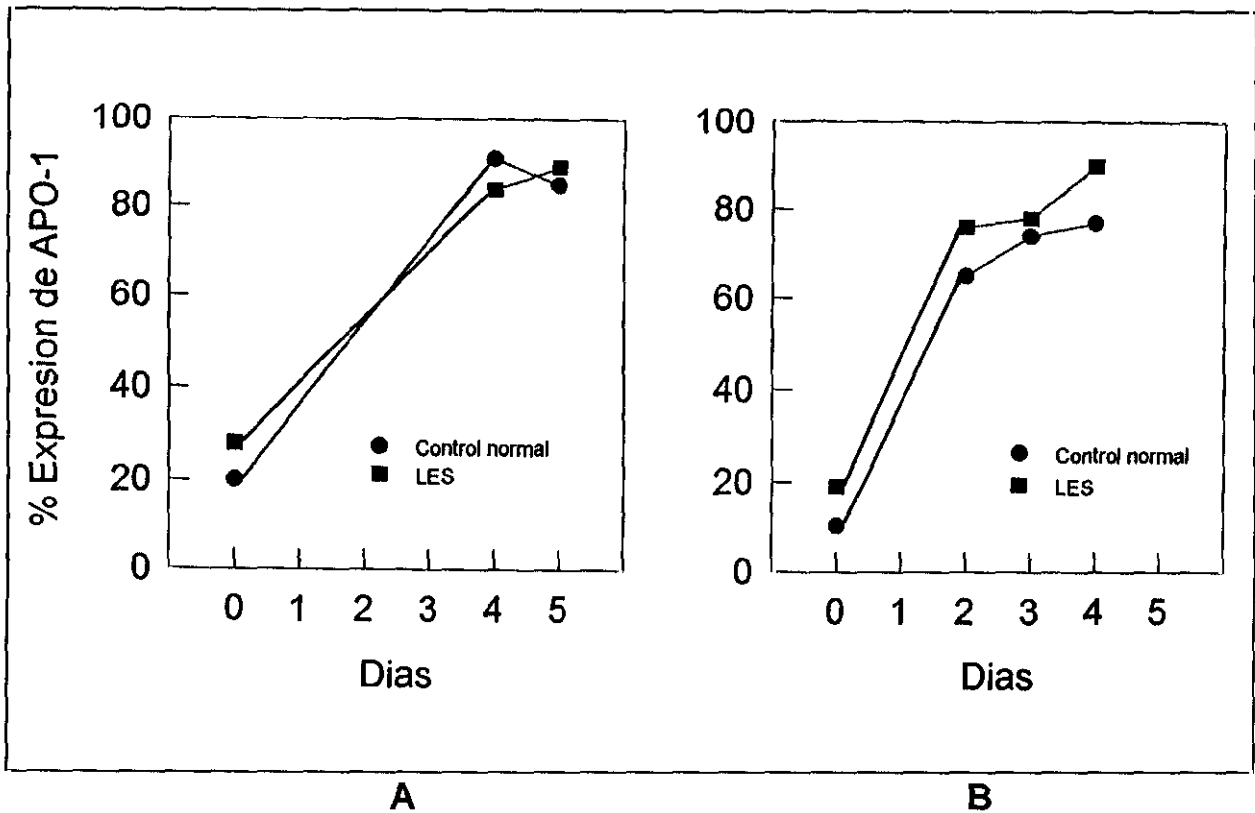
\* $p < 0.05$      $^\ddagger p < 0.01$

**Tabla 3.** Distribución de APO-1 en las poblaciones linfocitarias obtenidas de pacientes con LES. APO-1 se expresó predominantemente en células T de sangre periférica y dentro de éstas, en la subpoblación CD8+. Casi todas las células T que expresaban APO-1 mostraron un fenotipo de células activadas mostrando expresión de CD29.



### 2. 3. 5 EXPRESION DE APO-1 EN LINFOCITOS ACTIVADOS "IN VITRO"

Se estudiaron los cambios en la expresión de APO-1 tras la activación "in vitro" de los linfocitos de pacientes con LES y controles sanos. Se incubaron las células mononucleares de sangre periférica con anti-CD3 e IL-2 para inducir activación de células T. Se aislaron células B de sangre periférica y se cultivaron con SAC e IL-2 para inducir activación de células B <sup>215</sup>. Se analizó la expresión de APO-1 en células T mediante doble tinción de citometría de flujo para APO-1 y anti-CD3 en los días 0, 4 y 5 de cultivo. Y en células B mediante doble tinción para APO-1 y anti-CD19 en los días 0, 2, 3 y 4. A los 4 días de cultivo se observó un incremento superior al 90% en la expresión de APO-1 tanto en células T como B y tanto en pacientes con LES como en controles sanos. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con LES y los controles en el porcentaje de expresión, en la intensidad de expresión o en la cinética de incremento de APO-1 tras inducción de activación tanto en células T como B (Figura 22).

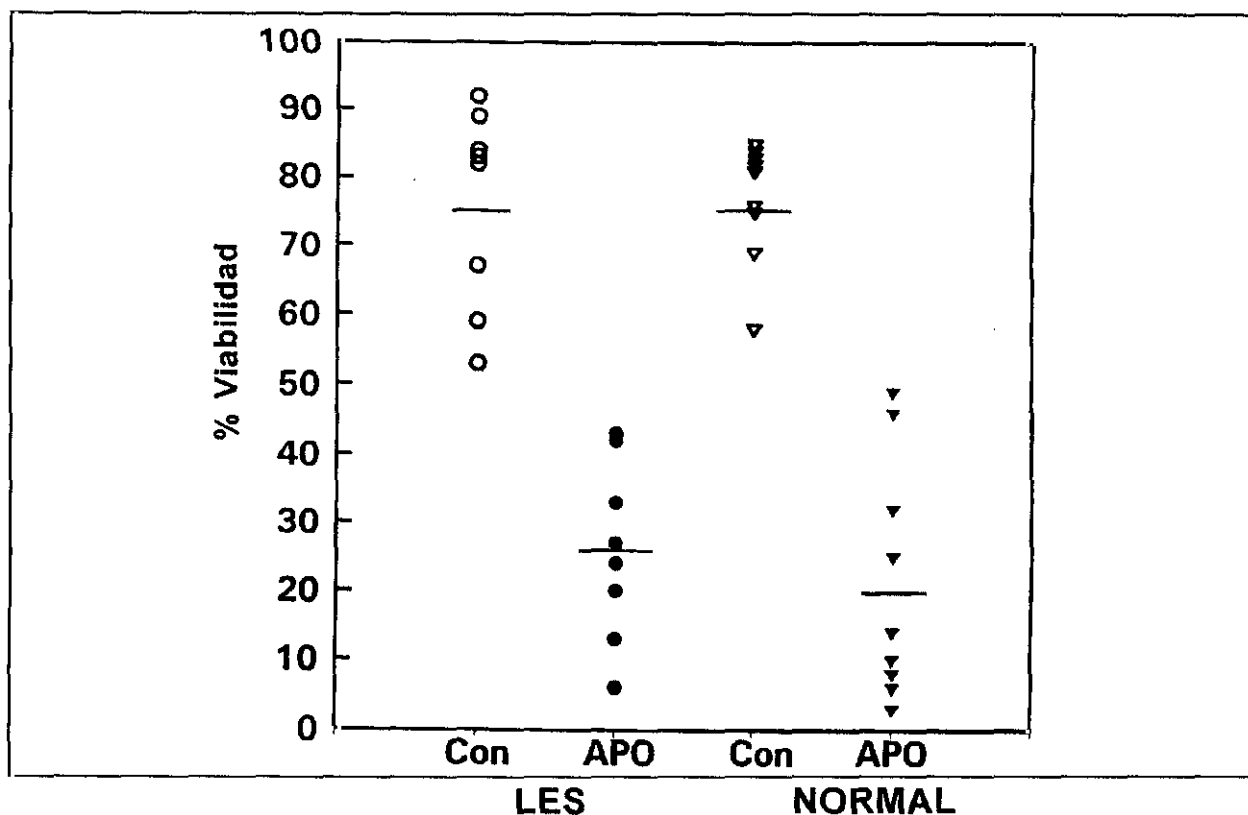


**Figura 22.** Expresión de APO-1 en linfocitos activados "in vitro". (A) Se cultivaron  $2 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica en presencia de anti-CD3 e IL-2 durante 5 días. Se analizó la expresión de APO-1 en células T mediante doble tinción de citometría de flujo a los días 0, 4 y 5. Se muestra la media de los resultados de 5 pacientes con LES y 5 controles sanos. (B) Se cultivaron células B aisladas de sangre periférica y se cultivaron con 0.02% SAC e IL-2 durante 4 días. Se analizó la expresión de APO-1 en células B mediante doble tinción de citometría de flujo a los días 0, 2, 3 y 4. Los resultados reflejan la media de 4 pacientes con LES y 4 controles sanos.

## 2. 3. 6 ENSAYO DE INDUCCION DE APOPTOSIS EN LINFOCITOS ACTIVADOS

Se estudió si el incremento de la expresión de APO-1 de células T de sangre periférica activadas "in vitro" de pacientes con LES era funcional y por tanto eran susceptibles de sufrir apoptosis. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LES o controles sanos con anti-CD3 e IL-2 para inducir activación de las células T. A los 5 días de cultivo, se añadió al cultivo de  $2 \times 10^6$  células  $1 \mu\text{g/ml}$  de IgG3 anti-APO-1 ratón anti-humano o el anticuerpo control isotipo junto con  $0.8 \mu\text{g/ml}$  del anticuerpo IgG conejo anti-ratón para optimizar el entrecruzamiento <sup>87</sup>. Al añadir al cultivo anti-APO-1, éste se fija al receptor de superficie celular APO-1 y se crea una situación que mimetiza el encuentro entre el receptor y su ligando mediante la cual se desencadena la muerte celular por apoptosis. Doce horas después del cultivo con anti-APO-1 o el anticuerpo control isotipo, se determinó la viabilidad celular mediante tripán azul, la proliferación celular mediante incorporación de timidina tritiada y se realizó un análisis cualitativo de apoptosis mediante el examen del ADN celular.

Mediante tripán azul, se encontró que a los 5 días de cultivo, momento en el que más del 90% de las células expresaban APO-1, el porcentaje de muerte celular de las células en cultivo expuestas a los anticuerpos anti-APO-1 y de entrecruzamiento, era del  $74\pm 5\%$  para los pacientes con LES. Este porcentaje no mostró una diferencia significativa cuando se comparó con el observado en las células de los controles sanos ( $79\pm 6\%$ ) ( $p > 0.05$ ). No se observó muerte celular en los cultivos celulares expuestos al anticuerpo control isotipo o al anticuerpo de entrecruzamiento solo (Figura 23).

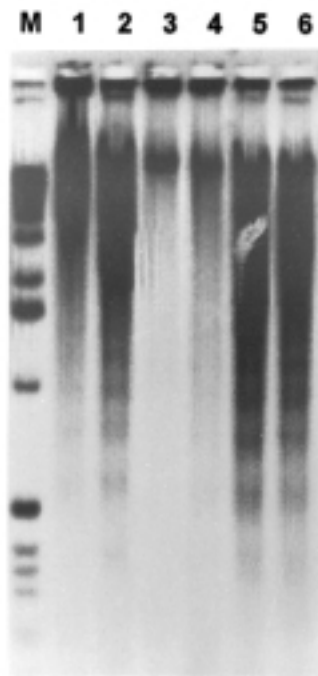


**Figura 23.** Inducción de apoptosis "in vitro" de linfocitos T de pacientes con LES.

Las células mononucleares de sangre periférica fueron incubadas con anti-CD3 e IL-2 durante 5 días. A continuación se incubaron  $2 \times 10^6$  células con  $1 \mu\text{g/ml}$  del anticuerpo control (Con) o anti-APO-1 (APO), ambos con  $0.8 \mu\text{g/ml}$  de IgG conejo anti-ratón para facilitar el entrecruzamiento. A las 12 horas se determinó el porcentaje de viabilidad celular con tripán azul. La línea horizontal muestra la media en cada grupo.

Estos hallazgos fueron confirmados mediante estudio de proliferación midiendo la incorporación de timidina tritiada. Se observó proliferación en las células expuestas al anticuerpo control isotipo:  $31612 \pm 11814$  cuentas por minuto (cpm) para pacientes con LES y  $56246 \pm 21490$  cpm para controles sanos. En cambio, no se observó proliferación en los cultivos expuestos a los anticuerpos anti-APO-1 y de entrecruzamiento:  $2368 \pm 826$  cpm para pacientes con LES y  $2783 \pm 1549$  cpm para los controles sanos. No se encontraron diferencias entre los pacientes con LES y los controles.

Para comprobar si la muerte celular se debía específicamente a apoptosis, se analizó el ADN liberado del núcleo celular mediante el ensayo de fragmentación de ADN. Este método permite estudiar cualitativamente si existe apoptosis y revela las características bandas de 200 pares de base al analizar el ADN extraído de células muertas por apoptosis en un gel de agarosa. Se encontraron estas bandas de 200 pares de base en los cultivos celulares expuestos al anticuerpo anti-APO-1 junto con el anticuerpo de entrecruzamiento tanto de los pacientes con LES como de los controles. Sin embargo, no se observaron en los cultivos con el anticuerpo control isotipo junto con el anticuerpo de entrecruzamiento (Figura 24).



**Figura 24.** Inducción de apoptosis mediante APO-1 de células T de pacientes con LES. Se indujo la apoptosis de células T activadas como se describió en la figura 23. Se aisló el ADN liberado mediante extracción en fenol/cloroformo. Se realizó electroforesis del ADN en un gel de agarosa al 2%, se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió con una cámara de vídeo. Se muestra el ADN liberado obtenido de linfocitos incubados con el anticuerpo control (líneas 1, 3 y 4) y anti-APO-1 (líneas 2, 5 y 6) de un paciente representativo con LES (líneas 3 y 5) y dos controles sanos (líneas 1, 2, 4 y 6). Los marcadores de peso molecular se muestran en la línea M. Las bandas teñidas aparecen de color negro porque la imagen fue obtenida en modo inverso.

### 2. 3. 7 ENSAYO DE INDUCCION DE APOPTOSIS EN CELULAS FRESCAS

Como el porcentaje de expresión de APO-1 en células frescas de sangre periférica de pacientes con LES estaba elevado, se estudió el efecto que producía la exposición al anticuerpo anti-APO-1 de células mononucleares totales y células B aisladas de sangre periférica. Las células frescas fueron cultivadas en las mismas condiciones ya descritas para las células cultivadas con mitógenos durante 16 horas al cabo de las cuales se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante tripán azul. No se produjo muerte celular y no se encontraron diferencias en la viabilidad celular entre las células expuestas a anti-APO-1 o al anticuerpo control isotipo. Tampoco se encontraron diferencias entre los pacientes con LES o los controles sanos o entre las células mononucleares totales o las células B aisladas (Tabla 4).

No se pudo determinar la inducción de apoptosis en células B activadas "in vitro" debido al escaso número de células B en pacientes con LES recuperadas a los 5 días de cultivo.



	Células mononucleares		Células B	
	Anti-APO-1	Control	Anti-APO-1	Control
LES	94±7	91±4	96±2	94±4
Normal	90±9	91±6	90±9	93±10

**Tabla 4.** Porcentaje de viabilidad de células mononucleares totales y células B frescas de sangre periférica de pacientes con LES y controles sanos tras exposición a anti-APO-1. Se incubaron  $2 \times 10^6$  células frescas con  $1 \mu\text{g/ml}$  del anticuerpo control o anti-APO-1 junto con  $0.8 \mu\text{g/ml}$  de IgG conejo anti-ratón durante 16 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Se analizó la viabilidad celular mediante tripán azul.

## **IV. 3 DISCUSSION**

### 3. 1 ESTUDIOS DEL FASR EN RATONES

Los resultados obtenidos en este trabajo al describir la distribución de la proteína FasR en timocitos y en linfocitos maduros de bazo y ganglios linfáticos murinos usando un anticuerpo policlonal anti-FasR mediante citometría de flujo, mostraron una expresión del FasR en la mayoría de los timocitos procedentes de ratones normales Balb/c y de la cepa con manifestaciones autoinmunes MRL/++ pero no de la cepa autoinmune MRL/lpr (Figura 1). Estos hallazgos fueron coherentes con los demostrados previamente mediante "northern blot" <sup>3</sup>, RCP cuantitativa <sup>136</sup> y citometría de flujo <sup>199</sup>.

El desarrollo de las células T en el timo es un proceso complejo y no completamente esclarecido a través del cual las células T en desarrollo experimentan una serie de cambios fenotípicos y funcionales <sup>221</sup>. Se pueden distinguir tres estadios principales en el desarrollo de los timocitos. Los precursores intratímicos de las células T comprenden una pequeña población celular que representa el 2-3% del total de los timocitos en el ratón adulto. Estas células no expresan CD4 ni CD8, son por tanto células dobles negativas, ni tampoco expresan el TCR/ $\alpha\beta$ . La gran mayoría de los timocitos, aproximadamente el 80%, se encuentran en un estadio intermedio del desarrollo caracterizado por la expresión de CD4 y CD8, son las células dobles positivas. Estos timocitos dobles positivos se diferencian según su nivel de expresión medio o bajo del

TCR/ $\alpha\beta$  y CD3 en células en un estadio más o menos avanzado de maduración respectivamente. Las células dobles positivas muestran además niveles elevados de expresión de HSA. Tanto la selección positiva de aquellas células que pueden reconocer las moléculas propias del CMH como la selección negativa (el proceso de eliminación clonal de los timocitos autorreactivos) transcurren en este estadio de desarrollo <sup>19</sup>. Las células que no son seleccionadas positivamente o aquellas que son seleccionadas negativamente mueren por un proceso de apoptosis <sup>25,26</sup>. Las células en estadios más avanzados de maduración emigran desde la corteza a la médula del timo, donde pierden la expresión de CD4 o CD8, son las células únicas positivas. Estas células presentan una expresión elevada del TCR/ $\alpha\beta$  y CD3 y expresan poco o nada HSA. Este estadio más avanzado de maduración sólo es alcanzado por unas pocas células; ambas poblaciones de células únicas positivas CD4+CD8- o CD4-CD8+ representan conjuntamente el 15% de la población total del timo en ratones adultos. Aunque la selección negativa se produce predominantemente en las células dobles positivas, una proporción de células únicas positivas permanecen sensibles a la apoptosis inducida por activación <sup>222</sup>. Surh y Sprent <sup>223</sup> demostraron, mediante una técnica que detecta células con fragmentos de ADN conocida como TUNEL ("TdT-mediated d-UTP biotin nick end-labelling", marcaje con d-UTP en las terminaciones de los fragmentos de ADN), apoptosis dispersa en células de la corteza y muy escasa en la médula del timo. Estos autores, utilizando secciones de timo de ratones deficientes en el CMH de clases I y II, observaron una tasa de apoptosis en la corteza y médula similar a los ratones normales,

lo que implica que la apoptosis observada no obedece a una selección negativa mediada por el CMH. En ratones transgénicos para el V $\beta$ 5, en los cuales se produce una delección de las células T V $\beta$ 5+ en un contexto del CMH de clase I, observaron una elevada concentración de células apoptóticas en la médula. Sugirieron que probablemente la mayoría de los timocitos sufre apoptosis en la corteza por falta de selección positiva y en menor proporción en la médula por un mecanismo de selección negativa <sup>223</sup>.

En este trabajo encontramos que la mayoría de los timocitos totales expresaban el FasR (Figura 1), aunque la expresión fue distinta según el estadio de desarrollo (Figura 2). Aproximadamente el 30% de los timocitos dobles negativos de ratones normales adultos expresaban el FasR. Estas células dobles negativas constituyen una población heterogénea en distintos estadios de maduración <sup>19</sup>. Andjelic et al <sup>224</sup> analizaron detalladamente la expresión del FasR en esta población doble negativa y encontraron que la máxima expresión se debía a las células CD44+ CD25-. Estas células comprenden los precursores T en un estadio más precoz de desarrollo y algunas células no T incluyendo células B y células de estirpe mieloide así como unas pocas células dobles negativas HSA+ TCR+ <sup>225, 226</sup>.

Asimismo, en el timo encontramos la máxima expresión del FasR en las células dobles positivas mientras que las únicas positivas presentaban una menor expresión del

FasR (Figura 2). Andjelic et al <sup>224</sup> encontraron que entre las células únicas positivas, la expresión del FasR era mayor en la población CD4+ que en la CD8+. Se sabe que al menos el 95% de los timocitos muere por apoptosis antes de emigrar a la periferia. Como los procesos de selección negativa y positiva ocurren probablemente en el estadio de maduración correspondiente a las células dobles positivas <sup>19</sup> y como el FasR induce apoptosis en los timocitos dobles positivos <sup>227</sup>, la elevada expresión del FasR en las células dobles positivas sugeriría que el FasR está involucrado en los mecanismos de selección tímica <sup>5</sup>. No se ha evidenciado sin embargo que exista defecto alguno en la selección negativa en ratones *lpr*, deficientes en la proteína FasR <sup>153</sup>. Además, como la mayoría de las células T periféricas no expresan el FasR, se podría hipotetizar que los timocitos en un estadio más avanzado de desarrollo disminuyen la expresión del FasR a medida que maduran y emigran del timo a la periferia. Alternativamente, y teniendo en cuenta que los timocitos únicos positivos conservan la susceptibilidad a la inducción de muerte celular tras activación, es posible que los timocitos únicos positivos FasR positivos mueran inmediatamente antes de salir a la periferia.

Sin embargo, los resultados de la expresión del FasR en timo humano son discordantes. Debatin et al <sup>228</sup> encontraron mediante citometría de flujo que APO-1 se expresaba en la mayoría de los timocitos humanos. La expresión de APO-1 decrece a medida que las células maduran y adquieren la expresión del TCR, además estas células maduras expresan Bcl-2. Encontraron la máxima expresión de APO-1 en timocitos

humanos con un nivel de expresión del TCR intermedio, células que presentan un fenotipo transicional CD4-CD8-, CD4+CD8<sup>bajo</sup> y CD4+CD8-. Además esta población con la máxima expresión de APO-1 e intermedia del TCR presentaba un alto porcentaje de células muertas, lo que sugiere que pudieran haber sufrido apoptosis inducida por activación y que probablemente el FasR desempeñase algún papel en la delección de estas células <sup>228</sup>. Por el contrario, Leithauser et al <sup>229</sup> no encontraron expresión de APO-1 en los linfocitos de timo humano.

En este trabajo <sup>230</sup> también analizamos la distribución topográfica del FasR en distintos órganos murinos mediante IHC e IME usando el mismo anticuerpo policlonal monoespecífico conejo anti-ratón anti-FasR ya descrito en los estudios de citometría de flujo (Figuras 10 a 13). Los resultados fueron coherentes. Se encontró un patrón de tinción de membrana en los órganos linfoides de ratones normales Balb/c. En el timo se observó tinción para el FasR en la corteza y unión córtico-medular, área anatómica donde se localizan los timocitos dobles positivos CD4+CD8+. En la médula tímica se observó tinción menos intensa en una población celular escasa correspondiente a las células CD4+CD8- o CD4-CD8+, la población en un estadio más maduro (Figura 10). Estos hallazgos son compatibles con una expresión del FasR proporcional a la tasa de apoptosis observada por Surh y Sprent <sup>223</sup> mediante la técnica TUNEL, que detectaron el mayor porcentaje de apoptosis en la corteza tímica.

Aunque detectamos cierto grado de condensación cromatínica en los timocitos con tinción positiva para el FasR mediante IME (Figura 13), la elevada tasa de apoptosis y la presencia de condensación cromatínica en los ratones MRL/lpr no demuestran que exista una relación funcional entre el FasR y la apoptosis en el timo <sup>223</sup>. Por otra parte, sólo realizamos tinción para IME en células no fijadas y aunque ello podría afectar la preservación de la morfología celular, no parece que el tiempo de duración del experimento (4-5 horas) fuera responsable de la condensación cromatínica celular ya que otros autores han observado que un retraso en la fijación celular de hasta 48 horas no incrementaba la tasa de apoptosis en el timo de ratas <sup>231</sup>.

Nuestros resultados demostraron que mediante análisis de citometría de flujo, en contraste con la expresión del FasR en timo, la expresión era considerablemente inferior en linfocitos maduros procedentes de bazo o ganglios linfáticos (Figuras 3 y 6), hallazgos que han sido demostrados en otros estudios <sup>199</sup>. Entre los linfocitos periféricos FasR positivos, la mayoría fueron células T CD4+, mientras que en los linfocitos B encontramos muy escasa expresión del FasR (Figuras 4 y 7). Mediante IHC encontramos una distribución del FasR en el bazo alrededor del manguito periarteriolar pero no en los folículos <sup>230</sup>, resultados coherentes con la distribución conocida de las células T y B (Figura 11). Por otra parte, detectamos el FasR en los folículos y manto de ganglios linfáticos normales <sup>230</sup> (Figura 12). Debido a que no realizamos IHC para dos anticuerpos, no se pudo identificar a qué supoblación linfocitaria correspondía la expresión del FasR.



El FasR ha sido detectado en células B de los sinusoides de ganglios linfáticos en humanos <sup>229</sup>. Como las células B mueren por apoptosis en los centros germinales <sup>232</sup>, sería interesante analizar la expresión del FasR en ganglios linfáticos de ratones inmunizados. Estos resultados en ratones se correlacionan con los encontrados en linfocitos de sangre periférica en humanos <sup>233</sup>, en los que se encontró una escasa expresión del FasR en células B y en células T nativas CD45RO-, mientras que la expresión era significativamente superior en células T memoria <sup>234</sup> CD45RO+ <sup>101</sup> (Tabla 3). En ratones no es posible estudiar si el FasR se expresa preferencialmente en células T memoria ya que no se dispone de marcadores de las mismas.

Nishimura et al <sup>235</sup>, usando ocho anticuerpos monoclonales anti-FasR distintos, encontraron una distribución de la expresión del FasR en órganos linfoides de ratones normales similar a la que se describe en este trabajo. Además, encontraron que el FasR no se expresa en células de médula ósea. Realizaron también un análisis funcional del FasR en timocitos, encontrando que los timocitos CD4+CD8+ eran sensibles a la apoptosis inducida por anti-FasR pero no lo eran los timocitos dobles negativos o los únicos positivos. Las células T del bazo mostraron una menor expresión del FasR comparada con la de timo y no eran sensibles al anti-FasR. Estos autores observaron un mayor porcentaje de células FasR positivas en bazo probablemente por mayor afinidad de sus anticuerpos. La administración "in vivo" del superantígeno enterotoxina B estafilocócica a ratones normales indujo la expansión clonal y posterior delección de

células T V $\beta$ 8, específicamente reactivas al superantígeno. Las células T de estos mismos ratones también murieron "in vitro" al ser expuestas al anti-FasR. Estos resultados no se obtuvieron en ratones *lpr*, lo que sugiere que la vía Fas está implicada en la delección de células autorreactivas activadas en la periferia <sup>235</sup>.

Utilizando el anticuerpo anti-FasR Jo2, Ogasawara et al <sup>227</sup> demostraron resultados similares a los de Nishimura et al <sup>235</sup>. Sin embargo, encontraron una población de timocitos CD4-CD8-CD3+ con una expresión del FasR similar a las células dobles positivas y únicas positivas, pero sólo las dobles positivas fueron susceptibles a la actividad citotóxica del anti-FasR. La inyección intraperitoneal del anti-FasR a ratones normales induce su muerte en 3-7 horas probablemente por fallo hepático <sup>170</sup>. El análisis de los timos a distintos intervalos tras la inyección del anti-FasR, permitió la observación de apoptosis desde las 3 horas. No detectaron apoptosis en los ratones *lpr* <sup>227</sup>.

En este trabajo observamos que la estimulación con mitógenos (concanavalina A para células T y LPS para células B) o la unión del receptor antigénico con anticuerpos monoclonales (anti-CD3 e IL-2 para células T y anti-IgM para células B) incrementó la expresión del FasR en linfocitos periféricos (Figuras 5 y 8). Estos resultados son consistentes con los que observamos en las células mononucleares de sangre periférica en humanos <sup>233</sup> (Figura 22). Las células humanas presentan un aumento en la expresión del FasR al ser cultivadas en presencia de IL-2 <sup>236</sup>, fitohemaglutinina <sup>2, 101, 237</sup>, interferón- $\gamma$

<sup>86</sup> o PWM <sup>238</sup>. Se ha especulado que la función del FasR en linfocitos periféricos sería la transmisión de señales de muerte celular tras activación <sup>2,88</sup>. La finalidad de esta función biológica sería la terminación de una proliferación inducida antigénicamente <sup>237</sup>. Aunque estos hallazgos no demuestran un papel del FasR en estos mecanismos, la estrecha asociación entre activación/proliferación celular <sup>239</sup> y la expresión del FasR apoyan esta hipótesis.

Miyawaki et al <sup>101</sup> encontraron que la expresión del FasR, tanto en linfocitos T como en linfocitos B procedentes de células mononucleares de sangre periférica humana, se incrementaba en función de la edad desde el nacimiento hasta los adultos. Estos estudios sugieren que existe una expansión en la población de linfocitos FasR positivos tras el nacimiento en relación con un mayor estímulo antigénico "in vivo" y por tanto con un mayor número de células activadas. De los resultados obtenidos en el presente estudio, se deduce que la expresión del FasR en órganos linfoides murinos no se modifica en relación con la edad del ratón puesto que no se observaron diferencias significativas al analizar comparativamente ratones jóvenes y adultos mediante citometría de flujo (Figura 9). Analizamos si en cepas murinas autoinmunes existiría un aumento en la expresión del FasR en relación con el comienzo de la actividad de la enfermedad puesto que se ha observado un mayor número de células activadas. Pero no objetivamos diferencias en la expresión del FasR entre ratones normales y ratones con manifestaciones autoinmunes. Por tanto, en las cepas murinas con LES no encontramos

---

que la expresión del FasR sufriera algún cambio en relación con el comienzo del desarrollo de la enfermedad.

Por el contrario, Zhou et al <sup>240</sup> al comparar ratones CD1 de 26 meses y 2 meses de edad encontraron una expresión más baja del FasR en timo y bazo en los ratones más adultos. En los ratones adultos observaron además que estaba disminuída la capacidad de apoptosis inducida mediante el FasL y que existía una menor respuesta proliferativa de las células T a anticuerpos anti-CD3. Esta respuesta a anti-CD3 originó una mayor producción de IL-2 en ratones adultos y de interferón- $\gamma$  e IL-10 en ratones jóvenes.

La inserción del retrotransposon ETn en el segundo intrón del gen del FasR en los ratones MRL/lpr induce una transcripción del ARNm del FasR reducida al menos 10 veces así como transcritos anormales FasR-ETn <sup>135-137</sup>. Se han detectado bajos niveles de expresión del ARNm del FasR normal en ratones MRL/lpr <sup>135,136</sup>. Mediante citometría de flujo, encontramos que los niveles de expresión del FasR en ratones MRL/lpr no excedieron los valores del anticuerpo control, posiblemente porque la sensibilidad de la citometría de flujo no es suficiente para detectar un número muy bajo de receptores por célula (Figuras 1, 3 y 6).

La selección negativa aparentemente normal que tiene lugar en el timo de los

ratones MRL/lpr podría ser explicada porque, aunque escasa, existe alguna "filtración" en la expresión del FasR<sup>135</sup>. Para estudiarlo, analizamos la expresión histológica del FasR en estos ratones<sup>230</sup>. No encontramos expresión en timo mediante IHC (Figura 10). Sin embargo, mediante IME detectamos partículas electrón-densas de oro en menor número y densidad en la superficie celular de los timocitos de ratones MRL/lpr comparados con los ratones Balb/c. La frecuencia fue 1 de cada 20 células en ratones MRL/lpr comparado con 19 de cada 20 células en ratones Balb/c (Figura 13). Además, los experimentos de inducción de apoptosis en timocitos dobles positivos de ratones MRL/lpr con un anticuerpo monoclonal agonista anti-FasR no han resultado satisfactorios<sup>227</sup>. Estos hallazgos sugieren que la expresión del FasR en el timo de ratones MRL/lpr es extremadamente escasa o no funcionante.

Como el FasR se expresa predominantemente en timocitos dobles positivos y en linfocitos periféricos activados, se pensó que la ausencia parcial o total del FasR en ratones MRL/lpr implicaría un deterioro en los mecanismos de tolerancia central y periférica. Esto conduciría al escape a la periferia de células potencialmente autorreactivas así como a la persistencia de células autorreactivas expandidas en la periferia. De esta manera se explicarían las manifestaciones autoinmunes graduales y la acumulación de células en los ganglios linfáticos que se han observado en los ratones con la mutación lpr. Corroboran esta hipótesis varios estudios en los que se ha demostrado que existe un defecto de la apoptosis en los timocitos dobles positivos TCR

---

nulo de ratones *lpr*<sup>241</sup> y en células T maduras de ratones *lpr* tratadas con anticuerpos anti-CD3<sup>154, 242</sup>.

La ausencia del FasR no es sin embargo una característica universal del LES murino, ya que en otras cepas murinas que desarrollan LES no se han observado anomalías en la expresión del FasR<sup>132, 133</sup> y en pacientes con LES se ha encontrado un aumento más que un defecto en la expresión del FasR<sup>233</sup>.

Mediante "northern-blot" se ha detectado expresión del ARNm del FasR en órganos no linfoides como corazón, hígado y ovario de ratones normales<sup>3</sup>. Además, Leithauser et al<sup>229</sup> observaron el FasR mediante IHC en órganos humanos como pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, colon y ovario. Por otra parte, se han encontrado formas truncadas del FasR debido a una división alternativa del ARNm, como los observados en hígado de rata<sup>243</sup> o en la línea celular B 2PK3<sup>200</sup>. En la línea celular 2PK3 se investigó dicha posibilidad porque no se detectaba expresión de la proteína mediante citometría de flujo y sin embargo expresaba ARNm del FasR aunque de menor tamaño. Este hecho se explica porque en la línea celular 2PK3 existe una delección en la secuencia de nucleótidos del FasR responsable de que su epítipo no sea reconocido por el anticuerpo anti-FasR<sup>200</sup>. Esta observación nos llevó a descartar que la no detección del FasR mediante IHC en dichos órganos fuera debida a la posible existencia de formas truncadas del FasR. Sin embargo, mediante el análisis de transcriptasa inversa-RCP

demostramos que no existían diferencias entre el tamaño del ADNc del FasR obtenido de corazón e hígado comparado con el de bazo procedente de ratones Balb/c (Figura 14). Una posible explicación de estos resultados es que debe existir un número relativamente bajo de receptores en estos órganos, lo que concuerda con los escasos niveles de expresión del ARNm del FasR encontrados en órganos no linfoides comparados con los de timo <sup>3</sup>.

Por el contrario, Leithauser et al <sup>229</sup> no encontraron expresión del FasR mediante IHC en timocitos corticales y medulares humanos aunque sí la encontraron en células epiteliales de timo. Además, como se discutirá posteriormente, encontramos que las células mononucleares frescas de sangre periférica de pacientes LES presentan una expresión del FasR significativamente más elevada al compararlos con controles sanos <sup>233</sup> (Figura 20). Así pues, aunque los ratones MRL/lpr desarrollan una enfermedad clínicamente similar al LES, aparentemente el LES humano y el modelo animal no comparten el mismo defecto del FasR. Queda por determinar si estas discrepancias se deben a diferencias de especies o a factores técnicos.

### 3. 2 ESTUDIOS DEL FASL EN RATONES

Diversos autores han demostrado que la transferencia de células de médula ósea procedentes de ratones con la mutación *gld* a ratones singénicos (perteneciente al mismo linaje genético) ++ sin mutación origina la aparición de un síndrome linfoproliferativo similar al que desarrollan los ratones *gld*<sup>244</sup>. Sin embargo, la transferencia de células de médula ósea procedentes de ratones con la mutación *lpr* induce la aparición de manifestaciones similares a la enfermedad de injerto contra huésped y la muerte del animal 2-4 meses después<sup>244-246</sup>. Ettinger et al<sup>247</sup> demostraron que co-cultivos "in vitro" de células T procedentes de ratones normales y ratones *lpr*, pero no de ratones normales y ratones *gld*, inducen una disminución de la supervivencia de las células T de ratones normales. Estos hallazgos podrían ser explicados por la presencia de una molécula citotóxica en las células T de ratones *lpr* ausente en ratones *gld*. Suda et al<sup>4</sup> observaron que el FasL tiene capacidad citotóxica y es capaz de inducir apoptosis en células que expresan el FasR. Por otra parte, Hammond et al<sup>248</sup> encontraron que las células T dobles negativas de ganglios linfáticos de ratones *lpr*, activadas a través del TCR/ $\alpha\beta$ -CD3 así como a través de algunas moléculas de adhesión como CD44 o  $gp90^{mel-14}$ , pueden provocar la lisis de células que expresen receptores de Fc. Estos últimos autores concluyeron que las células dobles negativas de ratones *lpr* no son inertes o anérgicas sino que son células T citotóxicas activadas. Estos hallazgos nos hicieron suponer que



---

probablemente los ratones *lpr*, y más concretamente sus atípicas células dobles negativas, podrían expresar altos niveles del FasL. Por ello analizamos la expresión de ARNm del FasL en órganos linfoides de ratones normales y mutantes.

En el presente trabajo <sup>249</sup>, no encontramos expresión del FasL en órganos linfoides en ratones adultos normales (Figura 15). Suda et al <sup>4</sup> ya habían detectado que la expresión de ARNm del FasL en ratas normales era débil en bazo y muy escasa o ausente en timo. Estos resultados contrastan con la expresión del FasR, que es alta en timocitos pero muy escasa en linfocitos periféricos ya maduros <sup>199, 224</sup>. Por tanto, en ratones normales la expresión del FasL no parece modificarse en relación al estadio de maduración celular.

En ratones adultos con las mutaciones *lpr* y *gld* encontramos una hiperexpresión del FasL en órganos linfoides, que fue más elevada en timo y ganglios linfáticos (Figuras 15 y 16). Descartamos que esta hiperexpresión fuera debida a una activación leve o transitoria, ya que los niveles eran superiores a los observados en esplenocitos activados "in vitro" procedentes de ratones adultos normales, en los que se habían demostrado niveles detectables del FasL <sup>4, 6</sup>. Asimismo, observamos que los niveles de expresión del FasL en los ganglios linfáticos de los ratones *lpr* y *gld* eran superiores a los de una línea celular T superantígeno-reactiva recién activada (Figura 17). Al asumir que la expresión del FasL es uniforme en la línea celular recién activada, estos hallazgos sugieren que

---

prácticamente todas o la mayoría de las células de los ganglios linfáticos hiperexpresan el FasL. Por otra parte, las células dobles negativas de los ratones *lpr* y *gld* parecen estar crónicamente activadas ya que expresan marcadores de activación como CD69<sup>127</sup>.

Inicialmente se publicó la secuencia del FasL de rata<sup>4</sup> y posteriormente la de ratón<sup>6</sup>, demostrándose que ambas presentan una homología en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del 90.6% y 91.4% respectivamente. Los resultados del presente trabajo<sup>249</sup> fueron obtenidos inicialmente con la sonda del FasL de rata y posteriormente con la de ratón, lo que permite suponer que entre una hibridación y la siguiente las membranas fueron sometidas a un proceso de lavado. Por este motivo, la señal obtenida con la sonda de ratón fue discretamente inferior a la obtenida con la sonda de rata (Figura 15).

La población celular predominante en los ganglios linfáticos de ratones *lpr* y *gld* está constituida por células T dobles negativas de fenotipo poco usual y que comprenden hasta un 90% del total. Analizamos la expresión del FasL en las poblaciones celulares de ganglios linfáticos de ratones adultos *lpr* y *gld*, seleccionando por un lado las células dobles negativas y por otro las células CD4+ junto con CD8+. Observamos que la expresión del ARNm del FasL era superior en las células dobles negativas (Figuras 16 y 17). Recientemente se ha sugerido que las células dobles negativas de estos ratones mutantes no son simplemente células inmaduras CD4-CD8- que han sido liberadas del

timo prematuramente. Herron et al <sup>153</sup> proponen que proceden de timocitos CD4+ y CD8+ que han sufrido un proceso de selección positiva mediado por el CMH de clase I y que posteriormente han perdido la expresión de CD4 o CD8. Su hipótesis se basa en que es una población celular autorreactiva que debe ser delecionada en la periferia, pero cuyo mecanismo de apoptosis está alterado debido al defecto en la vía Fas, por ello deben utilizar un mecanismo de control secundario que sería la pérdida de estos receptores CD4 o CD8 para prevenir el daño. Sugieren que el defecto del Fas opera en la periferia y no el timo, lo que permite la expansión de las células T dobles negativas. De los resultados obtenidos en el presente trabajo <sup>249</sup>, se puede deducir que el aumento de expresión del FasL en las células dobles negativas de ratones mutantes es explicable ya que el FasL se expresa tras estimulación antigénica y estas células no pueden morir. Así, es posible que las células únicas positivas de los ganglios linfáticos de ratones mutantes que también hiperexpresan el FasL hayan recibido un estímulo antigénico y estén destinadas a perder la expresión de CD4 o CD8.

Por otra parte, el aumento de expresión del FasL en el timo de ratones adultos *lpr* y *gld* podría ser explicado por la infiltración progresiva de células T maduras procedentes de la periferia que experimenta el timo de estos ratones <sup>123</sup>.

Basándose en experimentos de transferencia de células de médula ósea, Allen et al <sup>244</sup> fueron los primeros autores en sugerir que los fenotipos *lpr* y *gld* son el resultado

de mutaciones en una pareja de moléculas que actuarían como un ligando y su receptor. Asimismo, también propusieron que el receptor y su ligando estarían recíprocamente regulados. El aumento de expresión del FasL en ratones MRL/lpr es compatible con un modelo de regulación por retroalimentación, ya que estos ratones expresan el FasR en escasa o nula cantidad <sup>199</sup> debido a la inserción de un retrotransposón en el gen del FasR <sup>135-137</sup>. Sin embargo, en este trabajo <sup>249</sup> se demuestra que en ratones jóvenes MRL/lpr no existe una expresión aumentada del FasL (Figura 16). Además la expresión del FasL en ratones adultos lpr y gld de la misma edad presentaba niveles elevados similares, a pesar de que los ratones gld expresan niveles normales del FasR. Por el contrario, no detectamos un incremento en la expresión del FasR en ratones adultos. Esto es, no observamos un aumento de expresión del FasR en ratones gld, que hiperexpresan un FasL no funcional, al compararlos con ratones lpr<sup>co9</sup>, que expresan el FasR pero no es funcional, o con ratones normales (Figura 18). Nuestros hallazgos sugieren que el receptor y el ligando del Fas no están recíprocamente regulados en los ratones lpr y gld.

Por otra parte, en las células T periféricas de ratones adultos con las mutaciones lpr y gld, existe una menor expresión de Bcl-2 al compararlos con ratones normales de la misma edad debido fundamentalmente a las poblaciones de células dobles negativas y CD4 <sup>250</sup>. Esta diferencia no se observa en células de timo. Este hallazgo sugiere un mecanismo compensatorio para regular la apoptosis de las células T periféricas de estos

---

ratones mutantes, sin embargo no fue posible encontrar una correlación entre la baja expresión de Bcl-2 y la mayor susceptibilidad a apoptosis <sup>250</sup>.

En el presente trabajo <sup>249</sup> se demostró que las células no fraccionadas de ganglios linfáticos de ratones lpr, pero no de ratones gld, son capaces de inducir la lisis específicamente vía Fas en células diana que expresan el FasR como la línea celular A20 <sup>28,200</sup>. Se detectó actividad citotóxica en las células de ganglios linfáticos de ratones lpr sin que hubieran sido activadas, probablemente porque A20 expresa muy altos niveles del FasR u otras moléculas de superficie que facilitan la citotoxicidad mediada vía FasL. Al igual que Ramsdell et al <sup>251</sup>, observamos que las células de ganglios linfáticos de los ratones gld carecen de la capacidad citotóxica que presentan las de los ratones lpr (Figura 19). Asimismo, Hammond et al <sup>248</sup> demostraron que las células T dobles negativas de los ganglios linfáticos de ratones lpr muestran actividad citotóxica al ser activadas mediante anticuerpos contra moléculas de adhesión expresados por dichas células, siendo su capacidad lítica escasa o nula en ausencia de dicha activación. Observaron que estas células dobles negativas expresan perforina, como sucede en los linfocitos T citotóxicos profesionales o en los linfocitos "natural killer", por lo que sugieren que la actividad citotóxica es mediada por perforina. Para confirmar la actividad citotóxica de las células dobles negativas, utilizaron como diana algunas líneas celulares que expresaban el FasR como P815 o EL-4 <sup>112,200</sup>.

Nuestros resultados de expresión del FasL en ratones mutantes <sup>249</sup> concuerdan con los obtenidos por Watanabe et al <sup>252</sup> mediante "northern blot". Estos autores encontraron una hiperexpresión del ARNm del FasL en ganglios linfáticos y bazo de ratones adultos *lpr*, *lpr<sup>cg</sup>* y *gld* y ausencia de expresión en hígado. Mediante hibridación "in situ" e IHC observaron que la expresión del FasL correspondía a células CD4- CD8- Thy1+ B220+ situadas en las zonas marginales del bazo. Además demostraron que los linfocitos de bazo y ganglios linfáticos de ratones *lpr* pero no de ratones *gld* presentaban actividad citotóxica Fas-específica frente a células que expresaban el FasR pero no frente a las que no expresaban este receptor <sup>252</sup>.

El considerable aumento de expresión del ARNm del FasL y la actividad citotóxica mediada por el FasL de las células de ganglios linfáticos de ratones *lpr*, son hallazgos que sugieren que la expresión del FasL es responsable de que estas células desencadenen una enfermedad de injerto contra huésped al ser transferidas "in vivo" a ratones ++ y *gld*, así como que produzcan una reducida supervivencia de células normales al ser co-cultivadas "in vitro". Estos hallazgos no descartan que estén involucradas otras citoquinas secretadas por las células de ratones *lpr* <sup>253</sup>. La enfermedad de injerto contra huésped leve que se produce al transferir células de médula ósea de ratones *lpr<sup>cg</sup>* a ratones ++ podría ser explicado porque el FasL se una al FasR defectuoso de las células del donante, dejando escaso FasL libre para dañar las células del huésped. Si esto es así, las células irradiadas de la médula ósea del huésped deberían

---

de expresar el FasR.

Estudios de IHC en humanos <sup>229</sup> pero no en ratones <sup>230</sup> muestran que el FasR (APO-1) se expresa en linfocitos y en células mesenquimales como piel, hígado y tracto gastrointestinal, órganos diana en la enfermedad de injerto contra huésped. Estos hallazgos sugieren que la transferencia de células de médula ósea de ratones lpr podría inducir el desarrollo de células T maduras lpr que al ser expuestas a autoantígenos aumentarían la expresión del FasL. Como estas células hiperexpresan anormalmente el FasL no podrían morir vía Fas, persistiendo por tanto e induciendo apoptosis de las células radiorresistentes del huésped. Estas células también podrían inducir la liberación de citoquinas como interferón- $\gamma$  que incrementarían la expresión del FasR en células mesenquimales del huésped. Esto desencadenaría la apoptosis de células estromales y otras células mesenquimales del huésped necesarias para la supervivencia del sistema inmune. La inducción de apoptosis de células que expresarían el FasR como piel, hígado o tracto gastrointestinal desencadenaría la enfermedad de injerto contra huésped.

En definitiva, los niveles de expresión del FasR y el FasL en ratones normales y mutantes sugieren que podría producirse la siguiente secuencia de hechos. Cuando las células T normales son activadas, expresan el FasR <sup>2, 199, 236</sup> y el FasL <sup>4</sup>. Sin embargo, como la inducción de apoptosis del FasR no es funcional hasta pasados aproximadamente 6 días tras la activación <sup>237</sup>, las células activadas sufrirían un

expansión clonal. A medida que el FasR comenzara a ser funcionante, el FasL iría provocando la muerte de las células activadas. En el presente estudio <sup>249</sup> demostramos que la expresión del FasL es claramente superior en una línea celular T CD4+ TSST-1 reactiva comparada con linfocitos totales de bazo de ratones normales estimulados con mitógenos. Esto sugiere que la estimulación repetitiva o la diferenciación de las células T hacia el subtipo Th1 induciría una elevada expresión del FasL <sup>254</sup>. Aunque cabría esperar que la actividad citotóxica fuera en su mayor parte fratricida, no se descarta que también sea suicida, ya que tanto el receptor como el ligando del Fas pueden ser expresados en células T activadas. De esta forma, el Fas limitaría la expansión de células activadas y sería un mecanismo trascendental para eliminar aquellas células potencialmente autorreactivas.

Estos hallazgos son compatibles con un papel de la vía Fas en los mecanismos de tolerancia periférica. Russell et al <sup>154</sup> fueron los primeros en demostrar que la vía Fas es crítica en los mecanismos de tolerancia periférica. Estos autores cultivaron células CD4+ o CD8+ de ratones normales y ratones *lpr* en presencia de un superantígeno, lo que originó una activación y producción de citoquinas normalmente. Sin embargo, las células de ratones *lpr* presentaban un defecto cualitativo de apoptosis al ser re-estimuladas con el superantígeno una vez activadas <sup>154</sup>.

Por otra parte, Singer y Abbas <sup>255</sup> cruzaron ratones *lpr* con ratones transgénicos



para un TCR/ $\alpha\beta$  restringido por el CMH de clase II e inyectaron "in vivo" el antígeno para el que estas células eran reactivas. Se originó una delección similar de células CD4+ procedentes de timo tanto en los ratones transgénicos convencionales como en los ratones *lpr*, pero sólo se produjo una delección de células CD4+ periféricas en ratones transgénicos convencionales y no en los ratones *lpr*. Estos hallazgos sugieren que el Fas juega un papel en la delección de células T periféricas maduras pero no en la de células T tímicas. Por tanto, en los ratones *lpr* existe un defecto para la delección de células T autorreactivas en la periferia. Estas células T autorreactivas desarrollarían una actividad T cooperadora de células B específicas para autoantígenos lo que podría estimular la producción de autoanticuerpos.

La hipótesis de Singer y Abbas <sup>255</sup> fue confirmada mediante las siguientes observaciones. La expresión de CD4 durante la maduración celular T en el timo no requiere la expresión del CMH de clase II, pero la progresión de las células dobles positivas a las únicas positivas CD4+ sí depende de la expresión de clase II <sup>256</sup>. En ratones *lpr* deficientes en clase II, y por tanto deficientes en células CD4+, no se producen nefritis autoinmune ni autoanticuerpos aunque sí la masiva linfadenopatía <sup>257</sup>. La autoinmunidad en estos ratones *lpr* es por tanto atribuible a células T cooperadoras CD4+ autorreactivas y el mecanismo que permite la acumulación de las mismas obedece probablemente a un fallo en la tolerancia periférica al no producirse muerte celular tras activación. Esto enfatiza la importancia de la delección clonal periférica en el

---

mantenimiento de la autotolerancia y para evitar el desarrollo de autoinmunidad.

El papel propuesto para la vía Fas en la tolerancia periférica podría ser el siguiente. Las células T en reposo expresan muy bajos niveles del FasR y el FasL. Al reconocer un antígeno, aumentarían la expresión del receptor y del ligando del Fas. Después de unos días el receptor sería funcionante y las células tendrían la capacidad de inducir la muerte de unas a otras por apoptosis. En el ratón deficiente en el Fas, ya sea en el receptor o el ligando, estas células no morirían y por tanto se acumularían. Se podría deducir que la masiva expresión del FasL en ratones lpr se debe a una repetida exposición a autoantígenos en células que no pueden morir y por tanto persisten activadas. Estas células deben ser anergizadas para lo que probablemente desaparece su expresión de CD4 y CD8.

### 3. 3 ESTUDIOS DEL RECEPTOR APO-1 EN HUMANOS

Los defectos genéticos en los componentes iniciales de la vía del complemento constituyen una de las pocas anomalías moleculares conocidas que pueden predisponer al desarrollo del LES. Probablemente, a excepción de la deficiencia de C1q, las mutaciones nulas de las proteínas del complemento no son suficientes para desencadenar el LES. Deben pues existir otros mecanismos responsables del inicio de la enfermedad. La mayoría de las investigaciones se han centrado en la búsqueda de anomalías humorales y celulares en el LES. Las manifestaciones serológicas cardinales del LES, presencia de hipergammaglobulinemia y autoanticuerpos, han sido explicadas como el resultado de una activación policlonal de células B o un defecto en la actividad supresora o colaboradora de las células T, pero no está claro que estas alteraciones sean el primer evento en el LES. Los autoanticuerpos en el LES van dirigidos contra proteínas y nucleoproteínas, cuya producción se postula que es desencadenada como respuesta a un/os antígeno/s. El perfil de autoanticuerpos sugiere que una pérdida de la tolerancia a muchos antígenos podría ser el defecto central en el LES <sup>258</sup>.

Para determinar si los pacientes con LES presentan un defecto en la expresión, regulación o función del FasR/APO-1, cuantificamos estos parámetros en pacientes con LES y otras enfermedades autoinmunes sistémicas como AR y SSP en paralelo a

controles sanos <sup>233</sup>. En contraste con los ratones MRL/lpr <sup>5, 199</sup>, los pacientes con LES presentaron un porcentaje de expresión de APO-1 en células mononucleares de sangre periférica significativamente superior al compararlo con los controles sanos (Figura 20). Este aumento de expresión se observó tanto en linfocitos T como B, siendo más elevado en las células T CD8+ (Tabla 3). Como la expresión de APO-1 se incrementa tras estimulación de los linfocitos "in vitro" por mitógenos o por unión del antígeno al receptor <sup>2, 101, 199</sup> y como se ha observado un aumento en la expresión de APO-1 en otras enfermedades autoinmunes sistémicas, probablemente este aumento de expresión en pacientes con LES refleje una activación de los linfocitos "in vivo". Por otra parte, las células T tienen una vida media de meses a años mientras que la de las células B es de 5 a 7 días, a menos que reciban un estímulo y se conviertan en células memoria. Esto explicaría la mayor expresión de APO-1 en la población T comparada con la B como un mecanismo de autocontrol.

En individuos normales, los antígenos CD45RA y CD45RO son marcadores de células T nativas o memoria (previamente activadas) respectivamente <sup>234</sup>. Aunque las células T están activadas en el LES, algunos marcadores de activación T están aumentados (el CMH de clase II y la  $\beta$ -1 integrina CD29), mientras que otros no (receptor de IL-2 y CD45RO) <sup>259</sup>. Al igual que en individuos normales, en los pacientes con LES se detectó expresión de APO-1 casi exclusivamente en células T CD29+, lo que confirma que la expresión de APO-1 refleja activación celular (Tabla 3). Sin embargo, la ausencia

---

de una correlación significativa con el índice de actividad clínica SLEDAI o con otros parámetros serológicos de actividad de la enfermedad, indica que la relación entre la expresión de APO-1 y la activación linfocitaria es más compleja (Figura 21).

Estudios previos han demostrado que en pacientes con LES activo existe un aumento relativo de las células T CD4+, las cuales además expresan un mayor porcentaje relativo de antígenos del CMH de clase II comparadas con las células CD8+<sup>260, 261</sup>. Sin embargo, el aumento relativo de expresión de APO-1 en las células T de los pacientes con LES estudiados fue mayor en la subpoblación CD8+ comparada con la CD4+ (Tabla 3). El ligando de APO-1 ha sido involucrado en la citotoxicidad independiente de calcio mediada por células T<sup>112</sup>. Este hecho hace pensar que el aumento de expresión de APO-1 en las células CD8+ podría estar asociado a una expresión del ligando de APO-1 y que por tanto las células T CD8+ APO-1+ promoverían el daño tisular en los pacientes con LES. Además, Linker-Israeli et al<sup>177</sup> demostraron que en pacientes con LES, las células T CD8+ son necesarias para la producción espontánea "in vitro" de IgG por parte de las células B y sugirieron que las células CD8+ del LES pueden realizar una inusual función cooperadora debido a una producción anormal de citoquinas. En cualquier caso, es probable que el doble aumento de expresión de APO-1 de las células T CD8+ signifique que se trata de una población funcionalmente importante en la patogenia del LES. Sin embargo, hay que recordar que en los estudios realizados en ratones la población T que predominantemente expresaba el FasR era la

CD4+.

Dado que la mayoría de los pacientes con LES presentaban una expresión de APO-1 normal o aumentada, analizamos la capacidad de los linfocitos para incrementar la expresión de APO-1 tras estimulación y para inducir muerte celular. Tras activación "in vitro" de los linfocitos de pacientes con LES con mitógenos o unión al receptor, no fue posible detectar ningún defecto al compararlos con los controles normales (Figura 22). Asimismo, los linfocitos T de pacientes con LES fueron inducidos a sufrir apoptosis tras activación y subsecuente exposición al anticuerpo anti-APO-1, tal y como se observó en los linfocitos de los controles sanos <sup>101, 236</sup> (Figuras 23 y 24). No se analizó la inducción de apoptosis en células B activadas "in vitro" debido al escaso número de las mismas que se recuperaron a los 5 días de cultivo en pacientes con LES. Otros autores han demostrado apoptosis en células B humanas de individuos sanos activadas con PWM durante 6 días y expuestas a anti-APO-1 <sup>238</sup>. Aunque estos hallazgos no excluyen un papel del APO-1 en la etiopatogenia del LES, sugieren la ausencia de defectos en el receptor o en la vía de transmisión, ya que la apoptosis mediada por APO-1 permaneció intacta en los pacientes estudiados. Estas observaciones no aclaran sin embargo la existencia o no de un defecto en el ligando de APO-1 o en la capacidad de éste para inducir apoptosis.

Por otra parte, hay que considerar también la posibilidad de que estímulos

---

externos como radiación, toxinas o virus<sup>262</sup> permitan que las células autorreactivas en el LES sobrevivan y no induzcan apoptosis en las circunstancias apropiadas, tanto si es una apoptosis mediada vía APO-1 o no. Así, Hashimoto et al<sup>262</sup> mostraron que líneas celulares humanas que constitutivamente expresan la proteína del oncogen Eb1 del adenovirus tipo 2 presentaban resistencia a la muerte celular mediada vía Fas.

Los pacientes con LES, fundamentalmente los que presentan una enfermedad en fase de actividad, presentan linfopenia que afecta a la población T, tanto CD4 como CD8<sup>263</sup>. Aunque la linfopenia puede ser explicada en parte por la presencia de autoanticuerpos anti-linfocitos<sup>264</sup>, se ha observado que puede existir una deplección parcial de linfocitos T en ausencia de anticuerpos anti-células T detectable. Se ha demostrado que las células T tanto CD4 como CD8 de pacientes con SIDA son anormalmente sensibles a la apoptosis inducida tras estimulación, lo que sugiere que este fenómeno pudiera ser en parte responsable de la linfopenia que se observa en el SIDA<sup>36,37</sup>. Westendorp et al<sup>265</sup> observaron que linfocitos activados con anticuerpos anti-CD3 (mimetiza la unión al antígeno) o anti-CD4 (mimetiza la unión con la proteína gp120 del VIH) en presencia de la proteína transactivadora Tat del VIH, aumentan la expresión de ARNm del FasL lo que les hace más susceptibles a sufrir apoptosis. Los linfocitos T de individuos infectados con el VIH expresan niveles superiores del FasR comparados con los de controles no infectados<sup>266,267</sup>. Tras estimulación "in vitro", los linfocitos T de sangre periférica de individuos con el VIH sufren un mayor porcentaje de apoptosis al

compararlos con los controles no infectados en presencia de un anticuerpo anti-FasR <sup>267</sup>. Además, el porcentaje de apoptosis es superior en los linfocitos de pacientes VIH sintomáticos y se correlaciona inversamente con el número absoluto de linfocitos CD4 circulantes <sup>267</sup>. Los linfocitos T activados "in vitro" de pacientes con LES parecen mostrar una inducción de apoptosis vía APO-1 intacta (Figura 23), pero es posible que la expresión aumentada de APO-1 en los linfocitos les predisponga a una mayor susceptibilidad a sufrir apoptosis y en consecuencia se produzca linfopenia "in vivo". Sin embargo, encontramos que las células mononucleares frescas de sangre periférica aisladas de pacientes con LES no sufrieron un mayor porcentaje de apoptosis al ser expuestas al anticuerpo anti-APO-1 al compararlas con las células frescas aisladas de los controles (Tabla 4). Esto permite suponer que si APO-1 es responsable de la linfopenia en el LES, las células apoptóticas probablemente deben ser rápidamente eliminadas "in vivo".

Aderka et al <sup>268</sup> describieron en pacientes con LES una forma soluble del receptor FNT que se correlacionaba con la actividad de la enfermedad y que actuaba inhibiendo la actividad del receptor FNT, lo que podría modificar la intensidad de las manifestaciones del LES. Cheng et al <sup>96</sup> observaron que en células mononucleares de sangre periférica humana, tanto de pacientes con LES como de controles sanos, existe además del ARNm que codifica para el FasR, otra forma de ARNm que codifica para una proteína del FasR soluble. Esta variante carece del dominio transmembrana debido a una



delección del exón que codifica para esta región. Encontraron que la expresión de este FasR soluble estaba aumentada aproximadamente al doble en un 60% de los pacientes con LES al compararlos con controles sanos y pacientes con AR. Asimismo, demostraron que el FasR soluble podía neutralizar "in vitro" la acción apoptótica del anticuerpo anti-FasR sobre un cultivo de células estimuladas y que por tanto hiperexpresaban el FasR. Concluyeron que la forma soluble del FasR puede bloquear la interacción del FasR con el FasL y permite sobrevivir a las células autorreactivas <sup>96</sup>. El significado de estas observaciones está por esclarecer, porque el número de pacientes analizados era relativamente bajo (n=10) y los niveles del FasR soluble eran sólo el doble en los pacientes con LES comparados con los valores de los controles. Además, Knipping et al <sup>97</sup> encontraron que la expresión de APO-1 soluble era más elevada en suero de pacientes con artritis reumatoide juvenil (n=10) al compararlos con LES (n=27) y no detectaron diferencias significativas entre pacientes con LES activo e inactivo en base al índice de actividad SLEDAI. Poulton et al <sup>269</sup> encontraron que el cociente de ADNc del FasR / FasR soluble estaba aumentado en pacientes con LES (n=18) comparado con controles sanos (n=19).

Globalmente, los estudios realizados hasta ahora indican que la patogenia del LES humano no es el resultado de un defecto cualitativo o cuantitativo del FasR ni una alteración medible de la apoptosis "in vitro". El mecanismo a través del cual autoanticuerpos, linfocinas o virus <sup>262</sup> contribuyen al equilibrio entre la activación,

supervivencia o muerte de las poblaciones linfocitarias en pacientes con LES, así como el papel de otras moléculas involucradas en el proceso de la apoptosis <sup>270</sup>, constituyen aún áreas en vías de investigación.

## **IV. 4 CONCLUSIONES**

- 1.- La proteína FasR se expresa de forma similar sólo en los órganos linfoides de ratones normales y ratones con manifestaciones autoinmunes, salvo en los ratones MRL/lpr en los que la expresión está significativamente disminuída. El FasR se expresa predominantemente en timo, fundamentalmente a expensas de las células dobles positivas, presentando una expresión inferior en bazo y ganglios linfáticos.
  
- 2.- La activación "in vitro" induce un aumento en la expresión de la proteína FasR en los linfocitos de órganos linfoides murinos. No existen diferencias en la expresión del FasR entre ratones jóvenes y adultos, tanto en las cepas murinas normales como en las cepas con manifestaciones autoinmunes.
  
- 3.- El ARNm del FasL se hiperexpresa en timo y ganglios linfáticos de ratones adultos con las mutaciones lpr y gld, especialmente en las células dobles negativas de ganglios linfáticos, al compararlos con cepas murinas normales.
  
- 4.- La función del FasL hiperexpresado en ganglios linfáticos de ratones adultos lpr, pero no el de ratones gld, está conservada y por tanto tiene la capacidad de provocar la lisis de células que expresan el FasR.

- 5.- Las CMSP de pacientes con LES presentan una expresión basal del FasR significativamente superior comparados con los controles sanos pero no con los pacientes con AR o SSP. La expresión del FasR en pacientes con LES es predominante en los linfocitos T. Los niveles de expresión del FasR en CMSP de pacientes con LES no se correlacionan con los índices de actividad de la enfermedad.
- 6.- La activación "in vitro" de las CMSP no presenta diferencias significativas en los niveles y la cinética de expresión del FasR entre los pacientes con LES y los controles sanos.
- 7.- No existen alteraciones funcionales en la capacidad de transmitir apoptosis entre el FasR expresado en CMSP de pacientes con LES comparado con el de sujetos sanos.
- 8.- De estos resultados se infiere que existen alteraciones en la expresión y función del FasR o el FasL en los modelos murinos de LES con las mutaciones *lpr* y *gld* pero no se han confirmado estos defectos en el LES humano.

## **V. BIBLIOGRAFIA**

- 1.-Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- 2.-Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245: 301-305.
- 3.-Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; 148: 1274-1279.
- 4.-Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178.
- 5.-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: 314-317.
- 6.-Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; 76: 969-976.
- 7.-Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.
- 8.-Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 1986; 7: 115-119.
- 9.-Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Patterns of cell death. *Meth Achiev Exp Pathol* 1988; 13: 18-54.
- 10.-Savill J, Fadok VA, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today* 1993; 14: 131-136.
- 11.-Wyllie AH. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 1993; 67: 205-208.
- 12.-Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem* 1993; 268: 3037-3039.
- 13.-Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.

- 14.-Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984; 132: 38-42.
- 15.-Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J* 1993; 12: 371-377.
- 16.-Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-399.
- 17.-Vaux DL. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 786-789.
- 18.-Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
- 19.-Nikolic-Zugic J. Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of  $\alpha\beta$  T cells. *Immunol Today* 1991; 12: 65-70.
- 20.-Illera VA, Perandones CE, Stunz LL, Mower DA, Ashman RF. Apoptosis in splenic B lymphocytes. *J Immunol* 1993; 151: 2965-2973.
- 21.-Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T. Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1415-1420.
- 22.-Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity. *Ann Rev Immunol* 1992; 10: 267-293.
- 23.-Russell JH, Rush BJ, Abrams SI, Wang R. Sensitivity of T cells to anti-CD3-stimulated suicide is independent of functional phenotype. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1655-1658.
- 24.-Russell JH, White CL, Loh DY, Meleedy-Rey P. Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2151-2155.
- 25.-Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJT. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989; 337: 181-184.
- 26.-Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>lo</sup> thymocytes in vivo. *Science* 1990; 250: 1720-1723.
- 27.-Newell MK, Haughn LJ, Maroun CR, Julius MH. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 1990; 347: 286-289.



- 
- 28.-Stalder T, Hahn S, Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994; 152: 1127-1133.
- 29.-Shi Y, Szalay MG, Paskar L, Boyer M, Singh B, Green DR. Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphological aspects and DNA fragmentation. *J Immunol* 1990; 144: 3326-3333.
- 30.-Korsmeyer SJ. Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol Today* 1992; 13: 285-288.
- 31.-Wyllie AH, Morris RG. Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Am J Pathol* 1982; 109: 78-87.
- 32.-Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Ormerod MG, Dinsdale D. Identification of a transitional preapoptotic population of thymocytes. *J Immunol* 1993; 151: 566-574.
- 33.-Cohen GM, Sun XM, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 1994; 153: 507-516.
- 34.-Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
- 35.-Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Eng J Med* 1995; 333: 18-25.
- 36.-Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992; 175: 331-340.
- 37.-Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijnster MJ, Keet RPM, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; 257: 217-219.
- 38.-Meyaard L, Otto SA, Keet IPM, Roos MTL, Miedema F. Programmed death of T cells in human immunodeficiency virus infection. No correlation with progression to disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 982-988.
- 39.-Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, Baba TW, Ruprecht RM, Kupfer A. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Medicine* 1995; 1: 129-134.

- 
- 40.-Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol* 1995; 154: 5555-5566.
- 41.-Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 1995; 268: 429-431.
- 42.-Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 1993; 74: 777-779.
- 43.-Martin SJ, Lennon SV, Bonham AM, Cotter TG. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol* 1990; 145: 1859-1867.
- 44.-Tsujiimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome break point of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097-1099.
- 45.-Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-886.
- 46.-Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-336.
- 47.-Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993; 361: 365-369.
- 48.-Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
- 49.-Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. Bcl-2 inhibition of neural cell death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262: 1274-1277.
- 50.-Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993; 75: 229-240.
- 51.-Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 1995; 374: 814-816.

- 52.-Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* 1995; 374: 811-813.
- 53.-Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 1994; 13: 1899-1910.
- 54.-Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 1994; 79: 353-364.
- 55.-Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-6965.
- 56.-Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991; 67: 879-888.
- 57.-Strasser A, Harris AW, Cory S. Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991; 67: 889-899.
- 58.-Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, Harris AW. Enforced Bcl-2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8661-8665.
- 59.-Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992; 258: 1955-1957.
- 60.-Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz R. The *C. Elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-652.
- 61.-Núñez G, Merino R, Grillot D, González-García M. Bcl-2 and Bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol Today* 1994; 15: 582-588.
- 62.-Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Núñez G, Thompson CB. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
- 63.-Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.

- 
- 64.-Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374: 733-736.
- 65.-Farrow SN, White JHM, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R. Cloning of a Bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 1995; 374: 731-733.
- 66.-Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374: 736-739.
- 67.-Takayama S, Sato T, Krajewsky S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995; 80: 279-284.
- 68.-Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69: 119-128.
- 69.-Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H. Oncogenic activity of the c-myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 1993; 72: 233-245.
- 70.-Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by Bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554.
- 71.-Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-myc and Bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 1992; 359: 554-556.
- 72.-Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer therapy meets p53. *New Eng J Med* 1994; 331: 49-50.
- 73.-Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362: 849-852.
- 74.-Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849.
- 75.-Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-967.

- 76.-Strasser A, Harris AW, Jacks T, Cory S. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 1994; 79: 329-339.
- 77.-Hazel TG, Nathans D, Lau LF. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8444-8448.
- 78.-Christy BA, Lau LF, Nathans D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc fingers" sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7857-7861.
- 79.-Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 1994; 367: 277-281.
- 80.-Liu ZG, Smith SW, McLauhglin KA, Schwartz LM, Osborne BA. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 1994; 367: 281-284.
- 81.-Osborne BA, Smith SW, Liu ZG, MacLaughlin KA, Grimm L, Schwartz LM. Identification of genes during apoptosis in T lymphocytes. *Immunol Rev* 1994; 142: 301-320.
- 82.-Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$ -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. Elegans* cell death gene ced-3. *Cell* 1993; 75: 653-660.
- 83.-Enari M, Hug H, Nagata S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1995; 375: 78-81.
- 84.-Los M, Van de Craen M, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Baeuerle PA, Droge W, Krammer PH, Fiers W, Schulze-Osthoff K. Requirement of an ICE/Ced-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 1995; 375: 81-83.
- 85.-White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 1994; 264: 677-683.
- 86.-Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989; 169: 1747-1756.

- 87.-Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P, Krammer PH. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 1992; 149: 3166-3173.
- 88.-Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S-I, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243.
- 89.-Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Weber ML, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Ponstingl H, Krammer PH. Purification and molecular cloning of the Apo-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992; 267: 10709-10715.
- 90.-Beutler B, Van Huffel C. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 1994; 264: 667-668.
- 91.-Mallett S, Barclay AN. A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor. *Immunol Today* 1991; 12: 220-223.
- 92.-Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 1994; 76: 959-962.
- 93.-Clark EA. CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens* 1990; 35: 33-36.
- 94.-Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan ICM. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989; 342: 929-931.
- 95.-Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993; 268: 10932-10937.
- 96.-Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759-1762.
- 97.-Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJA, Mysler E, Elkon KB. Levels of soluble APO-1/Fas in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: S162 (abstract 19).
- 98.-Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen (FAS) to 10q24.1. *Genomics* 1992; 14: 821-822.

- 99.-Litcher P, Walczak H, Weitz S, Behrmann I, Krammer PH. The human APO-1 (APT) antigen maps to 10q23, a region that is syntenic with mouse chromosome 19. *Genomics* 1992; 14: 179-180.
- 100.-Krammer PH, Dhein J, Walczak H, Behrmann I, Mariani S, Matiba B, Fath M, Daniel PT, Knipping E, Westendorp MO, Stricker K, Baumler C, Hellbardt S, Germer M, Peter ME, Debatin K-M. The role of APO-1 mediated apoptosis in the immune system. *Immunol Rev* 1994; 142: 175-191.
- 101.-Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992; 149: 3753-3758.
- 102.-Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993; 74: 845-853.
- 103.-Grell M, Krammer PH, Scheurich P. Segregation of Apo-1/Fas antigen- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2563-2566.
- 104.-Schulze-Osthoff K, Krammer PH, Droge W. Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J* 1994; 13: 4587-4596.
- 105.-Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gerwitz DA, Grant S. Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 73-77.
- 106.-Kolesnick R, Fuks Z. Ceramide: a signal for apoptosis or mitogenesis?. *J Exp Med* 1995; 181: 1949-1952.
- 107.-Cifone MG, De Maria R, Roncaioli P, Rippo MR, Azuma M, Lanier LL, Santoni A, Testi R. Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 1994; 177: 1547-1552.
- 108.-Gill BM, Nishikata H, Chan G, Delovitch DL, Ochi A. Fas antigen and sphingomyelin-ceramide turnover-mediated signaling: role in life and death of T lymphocytes. *Immunol Rev* 1994; 142: 113-125.
- 109.-Eischen CM, Dick CJ, Leibson PJ. Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* 1994; 153: 1947-1954.

- 110.-Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC. FAP-1: A protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 1995; 268: 411-415.
- 111.-Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 178: 2231-2235.
- 112.-Rouvier E, Luciani M-F, Golstein P. Fas involvement in Ca<sup>2+</sup>-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993; 177: 195-200.
- 113.-Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994; 179: 873-879.
- 114.-Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456.
- 115.-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: 1567-1574.
- 116.-Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by Apo-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373: 438-441.
- 117.-Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, Green DR. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995; 373: 441-444.
- 118.-Ju S-T, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, El-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373: 444-448.
- 119.-Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 181: 71-77.
- 120.-Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, Murphy ED, Roths JB, Dixon FJ. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 1978; 148: 1198-1215.
- 121.-Watanabe T, Sakai Y, Miyawaki S, Shimizu A, Koiwai O, Ohno K. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 19, including the *lpr*, *Ly-44* and *Tdt* genes. *Biochemical Genetics* 1991; 29: 325-335.



- 122.-Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 243-269.
- 123.-Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 1985; 37: 269-390.
- 124.-Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 1984; 159: 1-20.
- 125.-Seldin MF, Morse III HC, Reeves PJ, Scribner CL, LeBoeuf RC, Steinberg AD. Genetic analysis of autoimmune gld mice. Identification of a restriction fragment length polymorphism closely linked to the gld mutation within a conserved linkage group. *J Exp Med* 1988; 167: 688-693.
- 126.-Matsuzawa A, Moriyama T, Kaneko T, Tanaka M, Kimura M, Ikeda H, Katagiri T. A new allele of the lpr locus, lpr<sup>og</sup>, that complements the gld gene in induction of lymphadenopathy in the mouse. *J Exp Med* 1990; 171: 519-531.
- 127.-Sobel ES, Yokoyama WM, Shevach EM, Eisenberg RA, Cohen PL. Aberrant expression of the very early activation antigen on MRL/Mp-lpr/lpr lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150: 673-682.
- 128.-Giese T, Allison JP, Davidson WF. Functionally anergic lpr and gld B220+ T cell receptor (TCR)- $\alpha/\beta$ + double-negative T cells express CD28 and respond to costimulation with phorbol myristate acetate and antibodies to CD28 and the TCR. *J Immunol* 1993; 151: 597-609.
- 129.-Singer PA, Theofilopoulos AN. Novel origin of lpr and gld T cells and possible implications in autoimmunity. *J Autoimmunity* 1990; 3: 123-135.
- 130.-Landolfi MMT, Van Houten N, Russel JQ, Scollay R, Parnes JR, Budd RC. CD2-CD4-CD8- lymph node T lymphocytes in MRL lpr/lpr mice are derived from a CD2+CD4+CD8+ thymic precursor. *J Immunol* 1993; 151: 1086-1096.
- 131.-Giese T, Davidson WF. Chronic treatment of C3H-lpr/lpr and C3H-gld/gld mice with anti-CD8 monoclonal antibody prevents the accumulation of double negative T cells but not autoantibody production. *J Immunol* 1994; 152: 2000-2010.
- 132.-Izui S, Kelley VE, Masuda K, Yoshida H, Roth JB, Murphy ED. Induction of various autoantibodies by mutant gene lpr in several strains of mice. *J Immunol* 1984; 133: 227-233.

- 133.-Warren RW, Caster SA, Roths JB, Murphy ED, Pisetsky DS. The influence of the *lpr* gene on B cell activation: differential antibody expression in *lpr* congenic mouse strains. *Clin Immunol Immunopathol* 1984; 31: 65-77.
- 134.-Carlsten H, Tarkowski A. Expression of heterozygous *lpr* gene in MRL mice. Defective T-cell reactivity and polyclonal B-cell activation. *Scand J Immunol* 1989; 30: 457-462.
- 135.-Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of *lpr* mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1756-1760.
- 136.-Chu JL, Drappa J, Parnassa A, Elkon KB. The defect in Fas mRNA expression in MRL/*lpr* mice is associated with insertion of the retrotransposon, ETn. *J Exp Med* 1993; 178: 723-730.
- 137.-Wu J, Zhou T, He J, Mountz JD. Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene. *J Exp Med* 1993; 178: 461-468.
- 138.-Kobayashi S, Hirano T, Kakinuma M, Uede T. Transcriptional repression and differential splicing of Fas mRNA by early transposon (ETn) insertion in autoimmune *lpr* mice. *Biochem and Biophys Res Comm* 1993; 191: 617-624.
- 139.-Mountz JD, Edwards III CK. Murine models of autoimmunity: T-cell and B-cell defects. *Curr Op Rheum* 1992; 4: 612-620.
- 140.-Wu J, Zhou T, Zhang J, He J, Gause WC, Mountz JD. Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-*lpr/lpr* mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2344-2348.
- 141.-Sobel ES, Cohen PL, Eisenberg RA. *lpr* T cells are necessary for autoantibody production in *lpr* mice. *J Immunol* 1993; 150: 4160-4167.
- 142.-Sobel ES, 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: 1441-1449.
- 143.-Shlomchik MJ, Madaio MP, Ni D, Trounstein M, Huszar D. The role of B cells in *lpr/lpr*-induced autoimmunity. *J Exp Med* 1994; 180: 1295-1306.

- 144.-Sobel ES, Kakkanaiah VN, Cohen PL, Eisenberg RA. Correction of gld autoimmunity by co-infusion of normal bone marrow suggests that gld is a mutation of the Fas ligand gene. *Int Immunol* 1993; 5: 1275-1278.
- 145.-Elkon KB. Apoptosis and SLE. *Lupus* 1994; 3: 1-2.
- 146.-Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990; 63: 1249-1256.
- 147.-Sprent J. T and B memory cells. *Cell* 1994; 76: 315-322.
- 148.-MacLennan ICM. Avoiding autoreactivity. *Nature*; 375: 281.
- 149.-Matsumoto K, Yoshikai Y, Asano T, Himeno K, Iwasaki A, Nomoto K. Defect in negative selection in lpr donor-derived T cells differentiating in non-lpr host thymus. *J Exp Med* 1991; 173: 127-136.
- 150.-Zhou T, Bluethmann H, Eldridge J, Brockhaus M, Berry K, Mountz JD. Abnormal thymocyte development and production of autoreactive T cells in T cell receptor transgenic autoimmune mice. *J Immunol* 1991; 147: 466-474.
- 151.-Singer PA, Balderas RS, McEvelly RJ, Bobardt M, Theofilopoulos AN. Tolerance-related V $\beta$  clonal deletions in normal CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, TCR- $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> and abnormal lpr and gld cell populations. *J Exp Med* 1989; 170: 1869-1877.
- 152.-Sidman CL, Marshall JD, Von Boehmer H. Transgenic T cell receptor interactions in the lymphoproliferative and autoimmune syndromes of lpr and gld mutant mice. *Eur J Immunol* 1992; 22:499-504.
- 153.-Herron LR, Eisenberg RA, Roper E, Kakkanaiah VN, Cohen PL, Kotzin BL. Selection of the T cell repertoire in lpr mice. *J Immunol* 1993; 151: 3450-3459.
- 154.-Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R. Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4409-4413.
- 155.-Scott DE, Kisch WJ, Steinberg AD. Studies of T cell deletion and T cell anergy following in vivo administration of SEB to normal and lupus-prone mice. *J Immunol* 1993; 150: 664-672.

- 156.-Wang Z, Dudhane A, Orlikowsky T, Clarke K, Li X, Darzynkiewicz Z, Hoffmann MK. CD4 engagement induces Fas antigen-dependent apoptosis of T cell in vivo. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1549-1552.
- 157.-Elkon KB. Apoptosis in SLE - too little or too much?. *Clin Exp Rheum* 1994; 12: 553-559.
- 158.-Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995; 16: 39-43.
- 159.-Vignaux F, Golstein P. Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngenic activated lymphocytes: a regulatory pathway?. *Eur J Immunol* 1994; 24: 923-927.
- 160.-Singer GG, Carrera AC, Marshak-Rothstein A, Martínez-A C, Abbas AK. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Op Immunol* 1994; 6: 913-920.
- 161.-Golstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 1991; 121: 29-65.
- 162.-Heusel JW, Wesseischmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogenic target cells. *Cell* 1994; 76: 977-987.
- 163.-Yagita H, Nakata M, Kawasaki A, Shinkai Y, Okumura K. Role of perforin in lymphocyte-mediated cytolysis. *Adv Immunol* 1992; 51: 215-242.
- 164.-Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369: 31-37.
- 165.-Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265: 528-530.
- 166.-Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1990; 370: 650-652.
- 167.-Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, Shinohara M, Matsuzawa A, Nishimura Y, Kobayashi Y, Yonehara S, Yagita H, Okumura K. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4930-4934.

- 168.-Nakajima H, Golstein P, Henkart PA. The target cell nucleus is not required for cell-mediated granzyme- or Fas-based cytotoxicity. *J Exp Med* 1995; 181: 1905-1909.
- 169.-Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 1995; 181: 1235-1238.
- 170.-Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364: 806-809.
- 171.-Shivakumar S, Tsokos GC, Datta SK. T cell receptor  $\alpha/\beta$  expressing double-negative (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) and CD4<sup>+</sup> T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J Immunol* 1989; 143: 103-112.
- 172.-Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, Jaffe JS, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W. A novel lymphoproliferative / autoimmune syndrome resembling murine *lpr/gld* disease. *J Clin Invest* 1992; 90: 334-341.
- 173.-Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81: 935-946.
- 174.-Rieux-Laucat F, Deist FL, Hivroz C, Roberts IAG, Debatin KM, Fischer A, Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268: 1347-1349.
- 175.-Boumpas DT, Tsokos GC, Mann DL, Eleftheriades EG, Harris CC, Mark GE. Increased proto-oncogen expression in peripheral blood lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 755-760.
- 176.-Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Bcl-2 and Fas, molecules which influence apoptosis. A possible role in systemic lupus erythematosus?. *Autoimmunity* 1994; 17: 271-278.
- 177.-Linker-Israeli M, Quismorio Jr. FP, Horwitz DA. CD8<sup>+</sup> lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4<sup>+</sup> cells to support autoantibody synthesis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1216-1225.

- 178.-Sakane T, Steinberg AD, Green I. Studies of immune functions of patients with systemic lupus erythematosus. Dysfunction of suppressor T-cell activity related to impaired generation of, rather than response to, suppressor cells. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 657-664.
- 179.-Tsokos GC, Magrath IT, Balow JE. Epstein-Barr virus induces normal B cell responses but defective suppressor T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1983; 131: 1797-1801.
- 180.-Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994; 152: 3685-3692.
- 181.-Van Houten N, Budd RC. Accelerated programmed cell death of MRL-lpr/lpr T lymphocytes. *J Immunol* 1992; 149: 2513-2517.
- 182.-Mohan C, Adams S, Stanik V, Datta SK. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med* 1993; 177: 1367-1381.
- 183.-Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* 1990; 86: 69-74.
- 184.-Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, Lotton C, Cabrespines A, Bach J-F, Jacob L. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1644-1688.
- 185.-Savill J. Apoptosis: from worm to wonder-drug?. *Br J Rheum* 1995; 34: 95-98.
- 186.-Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, Krueger JG. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B / ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest* 1992; 90: 1067-1076.
- 187.-Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1317-1330.
- 188.-Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med* 1995; 181: 1557-1661.

- 189.-Kumagai S, Yanagida H, Tsujimoto Y. Increased expression of Bcl-2 protein in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993; 36: S76 (abstract 226).
- 190.-Graninger WB, Aringer M, Steiner C, Smolen JS. Expression of the protooncogen Bcl-2 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993; 36: S77 (abstract 229).
- 191.-Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, Kiener H, Presterl E, Jaeger U, Smolen JS, Graninger WB. High levels of Bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994; 10: 1423-1430.
- 192.-Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Bcl-2 expression is unaltered in unfractionated peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheum* 1995; 34: 316-320.
- 193.-Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of Bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* 1993; 151: 621-627.
- 194.-Glimcher LH, Kim K-J, Green I, Paul WE. Ia antigen-bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex-restricted fashion to antigen-reactive T cells. *J Exp Med* 1982; 155: 445-459.
- 195.-Kim KJ, Kanellopoulos-Langevin C, Merwin RM, Sachs DH, Asofsky R. Establishment and characterization of Balb/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* 1979; 122: 549-554.
- 196.-Alt F, Rosenberg N, Lewis S, Thomas E, Baltimore D. Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MuLV-transformed cells: Rearrangement of heavy but not light chain genes. *Cell* 1981; 27: 381-390.
- 197.-Rosenberg N, Siden E, Baltimore D. Synthesis of  $\mu$  chains by Abelson virus-transformed cells and induction of light chain synthesis with lipopolysaccharide. En: B lymphocytes in the immune response. Cooper M, Mosier D, Scher C, Vitteta E, editores. Nueva York: Elsevier North Holland, 1979: 379-386.
- 198.-Lanier LL, Warner NL, Ledbetter JA, Herzenberg LA. Quantitative immunofluorescent analysis of surface phenotypes of murine B cell lymphomas and plasmacytomas with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1981; 127: 1691-1697.

- 199.-Drappa J, Brot N, Elkon KB. The Fas protein is expressed at high levels on CD4+CD8+ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10340-10344.
- 200.-Onel KB, Tucek-Szabo CL, Ashany D, Lacy E, Nikolic-Zugic J & Elkon KB. Expression and function of the murine CD95/FasR/APO-1 receptor in relation to B cell ontogeny. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2940-2947.
- 201.-Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- 202.-Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 54: 5463-5467.
- 203.-Erlandson RA. Diagnostic transmission electron microscopy of tumors with clinicopathological, immunohistochemical, and cytogenetic correlations. Nueva York: Raven Press 1994; 1: 1-68.
- 204.-Erlandson RA. A new Maraglas, D.E.R. 732, embedment for electron microscopy. *J Cell Biol* 1964; 22: 704-709.
- 205.-Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger Jr. TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-324.
- 206.-Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-1277.
- 207.-Bini P, Chu JL, Okolo C, Elkon KB. Analysis of autoantibodies to recombinant La (SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 1990; 85: 325-333.
- 208.-Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH, and the Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630-640.
- 209.-Ashany D, Hines J, Gharavi A, Mouradian J, Elkon KB. Analysis of autoantibody production in SCID-systemic lupus erythematosus (SLE) chimeras. *Clin Exp Immunol* 1992; 88: 84-90.



- 210.-Reinherz EL, Hussey RE, Schlossman SF. A monoclonal antibody blocking human T cell function. *Eur J Immunol* 1980; 10: 758-762.
- 211.-Takeuchi T, Rudd CE, Schlossman SF, Morimoto C. Induction of suppression following autologous mixed lymphocyte reaction; role of a novel 2H4 antigen. *Eur J Immunol* 1987; 17: 97-103.
- 212.-Morimoto C, Letvin NL, Boyd AW, Hagan M, Brown HM, Kornacki MM, Schlossman SF. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J Immunol* 1985; 134: 3762-3769.
- 213.-Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF, Schlossman SF. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J Immunol* 1983; 131: 244-250.
- 214.-Evans RL, Wall DW, Platsoucas CD, Siegal FP, Fikrig SM, Testa CM, Good RA. Thymus-dependent membrane antigens in man: inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T<sub>H2</sub> antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 544-548.
- 215.-Mapara MY, Bargou R, Zugck C, Dohner H, Ustaoglu F, Jonker RR, Krammer PH, Dorken B. APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur J Immunol* 1993; 23: 702-708.
- 216.-Crow MK, Jover JA, Friedman SM. Direct T helper-B cell interactions induce an early B cell activation antigen. *J Exp Med* 1986; 164: 1760-1772.
- 217.-International Committee for Standardization in Haematology. Recommendation for measurement of erythrocyte sedimentation rate of human blood. *Am J Clin Pathol* 1977; 68: 505-507.
- 218.-Molden DP, Nakamura RM, Tan EM. Standardization of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defined antibody specificity. *Am J Clin Pathol* 1984; 82: 57-66.
- 219.-Ballou SP, Kushner I. Anti-native DNA detection by the Crithidia Luciliae method. An improved guide to the diagnosis and clinical management of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 321-327.
- 220.-Cohen PL, Eisenberg RA. The lpr and gld genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane. *Immunol Today* 1992; 13: 427-428.

- 221.-Rothenberg EV. The development of functionally responsive T cells. *Adv Immunol* 1992; 51: 85-214.
- 222.-Rothenberg EV. Death and transfiguration of cortical thymocytes: a reconsideration. *Immunol Today* 1990; 11: 116-119.
- 223.-Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994; 372: 100-103.
- 224.-Andjelic S, Drappa J, Lacy E, Elkon KB, Nikolic-Zugic J. The onset of Fas expression parallels the acquisition of CD8 and CD4 in fetal and adult  $\alpha\beta$  thymocytes. *Int Immunol* 1994; 6: 73-79.
- 225.-Godfrey DI, Zlotnik A, Suda T. Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. *J Immunol* 1992; 149: 2281-2285.
- 226.-Suda T, Zlotnik A. Origin, differentiation, and repertoire selection of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes bearing either  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  T cell receptors. *J Immunol* 1993; 150: 447-455.
- 227.-Ogasawara J, Suda T, Nagata S. Selective apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes by the anti-Fas antibody. *J Exp Med* 1995; 181: 485-491.
- 228.-Debatin KM, Suss D, Krammer PH. Differential expression of APO-1 on human thymocytes: implications for negative selection?. *Eur J Immunol* 1994; 24: 753-758.
- 229.-Leithauser F, Dhein J, Mechttersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin K-M, Krammer PH, Moller P. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 1993; 69: 415-429.
- 230.-Ramos P, Gangi MD, Filippa D, Elkon KB. Immunohistochemical analysis of murine Fas/APO-1. *Arthritis Rheum* 1994; 37: S163 (abstract 25).
- 231.-Middleton G, Reid LE, Harmon BV. Apoptosis in the human thymus in sudden and delayed death. *Pathology* 1994; 26: 81-89.
- 232.-Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan ICM. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today* 1992; 13: 17-21.
- 233.-Mysler E, Bini P, Drappa J, Ramos P, Friedman SM, Krammer PH, Elkon KB. The Apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994; 93: 1029-1034.

- 234.-Cerottini JC, MacDonald HR. The cellular basis of T-cell memory. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 77-89.
- 235.-Nishimura Y, Ishii A, Kobayashi Y, Yamasaki Y, Yonehara S. Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *J Immunol* 1995; 154: 4395-4403.
- 236.-Owen-Schaub LB, Yonehara S, Crump III WL, Grimm EA. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol* 1992; 140: 197-205.
- 237.-Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993; 5: 625-630.
- 238.-Daniel PT, Krammer PH. Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. *J Immunol* 1994; 152: 5624-5632.
- 239.-Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 1993; 14: 338-340.
- 240.-Zhou T, Edwards III CK, Mountz JD. Prevention of age-related T cell apoptosis defect in CD2-Fas-transgenic mice. *J Exp Med* 1995; 182: 129-137.
- 241.-Zhou T, Bluethmann H, Eldridge J, Berry K, Mountz JD. Origin of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup> T cells in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol* 1993; 150: 3651-3667.
- 242.-Bossu P, Singer GG, Andres P, Ettinger R, Marshak-Rothstein A, Abbas AK. Mature CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from MRL/lpr mice are resistant to receptor-mediated tolerance and apoptosis. *J Immunol* 1993; 151: 7233-7239.
- 243.-Kimura K, Wakatsuki T, Yamamoto M. A variant mRNA species encoding a truncated form of Fas antigen in the rat liver. *Biochem and Biophys Res Comm* 1994; 198: 666-674.
- 244.-Allen RD, Marshall JD, Roths JB, Sidman CL. Differences defined by bone marrow transplantation suggest that lpr and gld are mutations of genes encoding an interacting pair of molecules. *J Exp Med* 1990; 172: 1367-1375.
- 245.-Fujiwara M, Kariyone A. One-way occurrence of graft-versus-host disease in bone marrow chimaeras between congenic MRL mice. *Immunology* 1984; 53: 251-256.

- 246.-Theofilopoulos AN, Balderas RS, Gozes Y, Aguado MT, Hang L, Morrow PR, Dixon FJ. Association of lpr gene with graft-vs-host disease-like syndrome. *J Exp Med* 1985; 162: 1-18.
- 247.-Ettinger R, Wang JKM, Bossu P, Papas K, Sidman CL, Abbas AK, Marshak-Rothstein A. Functional distinctions between MRL-lpr and MRL-gld lymphocytes. Normal cells reverse the gld but not lpr immunoregulatory defect. *J Immunol* 1994; 152: 1557-1568.
- 248.-Hammond DM, Nagarkatti PS, Gote LR, Seth A, Hassuneh MR, Nagarkatti M. Double-negative T cells from MRL-lpr/lpr mice mediate cytolytic activity when triggered through adhesion molecules and constitutively express perforin gene. *J Exp Med* 1993; 178: 2225-2230.
- 249.-Chu JL, Ramos P, Rosendorff A, Nikolic-Zugic J, Lacy E, Matsuzawa A, Elkon KB. Massive upregulation of the Fas ligand in lpr and gld mice: implications for Fas regulation and the graft-versus-host disease-like wasting syndrome. *J Exp Med* 1995; 181: 393-398.
- 250.-Tamura A, Yui K. Age-dependent reduction of Bcl-2 expression in peripheral T cells of lpr and gld mutant mice. *J Immunol* 1995; 155: 499-507.
- 251.-Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Tough TW, Alderson MR, Lynch DH. gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol* 1994; 24: 928-933.
- 252.-Watanabe D, Suda T, Hashimoto H, Nagata S. Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. *EMBO J* 1995; 14: 12-18.
- 253.-Murray LJ, Lee R, Martens C. In vivo cytokine gene expression in T cell subsets of the autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Eur J Immunol* 1990; 20: 163-170.
- 254.-Ju S-T, Cui H, Panka DJ, Ettinger R, Marshak-Rothstein A. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4185-4189.
- 255.-Singer GG, Abbas AK. The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994; 1: 365-371.
- 256.-Grusby MJ, Johnson RS, Papaioannou VE, Glimcher LH. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 1991; 253: 1417-1420.

- 257.-Jevnikar AM, Grusby MJ, Gimcher LH. Prevention of nephritis in major histocompatibility complex class II-deficient MRL-lpr mice. *J Exp Med* 1994; 179: 1137-1143.
- 258.-Elkon KB. Autoantibodies in SLE. En: *Textbook of Rheumatology*. Klippel JH, Dieppe PA, editores. Londres: Mosby-Year Book Europe Limited, 1994; 4.1-4.10.
- 259.-Horwitz D A. Systemic Lupus Erythematosus: Generalized autoimmunity arising from disordered immune regulation. En: *Arthritis and Allied conditions. A Textbook of Rheumatology*. McCarty DJ, Koopman WJ, editores. Filadelfia: Lea/Febiger, 1993; 1185-1199.
- 260.-Koide J. Functional property of Ia-positive T cells in peripheral blood from patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1985; 22: 577-584.
- 261.-Raziuddin S, Danial HB, Kelley M. OKT4+ T cell abnormality in patients with systemic lupus erythematosus: HLA-DR antigen expressions. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 48: 42-49.
- 262.-Hashimoto S, Ishii A, Yonehara S. The E1b oncogene of adenovirus confers cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor and monoclonal anti-Fas antibody. *Int Immunol* 1991; 3: 343-351.
- 263.-Kammer GM, Stein RL. T lymphocyte immune dysfunctions in systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med* 1990; 115: 273-282.
- 264.-Koide J, Takano M, Takeuchi T, Hosono O, Amano K, Homma M, Abe T. Direct demonstration of immunoregulatory T-cell defects in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1986; 23: 449-459.
- 265.-Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 1995; 375: 497-500.
- 266.-Debatin KM, Fahrig-Faissner A, Enenkel-Stoodt S, Kreuz W, Benner A, Krammer PH. High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* 1994; 83: 3101-3103.
- 267.-Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* 1995; 181: 2029-2036.

268.-Aderka D, Wysenbeek A, Engelmann H, Cope AP, Brennan F, Molad Y, Hornik V; Levo Y, Maini RN, Feldmann M, Wallach D. Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1111-1120.

269.-Poulton K, Hillarby MC, Ollier WER. Soluble Fas is increased in patients with SLE. *Br J Rheum* 1995; 34 Supl 1: 5 (abstract 5).

270.-Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254.

**ABREVIATURAS**

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ANA	Anticuerpos antinucleares
AR	Artritis reumatoide
ARN	Acido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
ASB	Albúmina sérica bovina
BSF	Bufer salino fosfato
CD	"Cluster of differentiation", grupos de diferenciación
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
Con A	Concanavalina A
cpm	Cuentas por minuto
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DE	Desviación standar

---

DEPC	Dietilpirocarbonato
DN	Dobles negativas
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
EDTA	Acido etilen-diamino tetra-acético
FasL	Ligando del receptor Fas
FasR	Receptor Fas
Fc	Fracción constante
FCN	Factor de crecimiento nervioso
FITC	"Fluorescein-isothiocyanate", isotiocianato de fluoresceína
FNT	Factor de necrosis tumoral
gld	"Generalized lymphoproliferative disease", enfermedad linfoproliferativa generalizada
HSA	"Heat stable antigen", antígeno estable al calor
ICE	"Interleukin 1 $\beta$ converting enzyme", enzima convertidor de interleuquina 1 $\beta$
Ig	Inmunoglobulina
IHC	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
IME	Inmunomicroscopía electrónica
INF	Interferón



---

Kd	Kilodalton
LES	Lupus eritematoso sistémico
lpr	"Lymphoproliferation", linfoproliferación
lpr <sup>cg</sup>	"lpr complementing gld", lpr complementando gld
LPS	Lipopolisacárido
PE	"Phycoerythrin", Ficoeritrina
PMA	Forbol miristato acetato
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SAC	Estafilococo Aureus Cowan
SDS	Sodio dodecil sulfato
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSP	Síndrome Sjögren primario
TA	Temperatura ambiente
TCR	"T cell receptor", Receptor de la célula T
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana