

# **ALTERACIONES DE LA APOPTOSIS COMO MECANISMO PATOGENICO EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

Tesis presentada por

**Carlos Miret Mas**

2003

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

## **INDICE GENERAL**

<b>I.</b>	<b>PRINCIPALES ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO.....</b>	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>6</b>
	<b>2.1. La apoptosis.....</b>	<b>7</b>
	2.1.1. Descripción del proceso de apoptosis.....	8
	2.1.2. Diferencias entre necrosis y apoptosis.....	9
	2.1.3. Regulación de la apoptosis.....	10
	2.1.4. La apoptosis y las enfermedades autoinmunes sistémicas.	12
	<b>2.2. Apoptosis e interleucinas.....</b>	<b>14</b>
	2.2.1. Consideraciones sobre la actividad de las citocinas.....	14
	2.2.2. Las citocinas y las enfermedades autoinmunes.....	15
	<b>2.3. Apoptosis y oncogenes.....</b>	<b>18</b>
	<b>2.4. Los genes reguladores de la apoptosis y las enfermedades</b>	
	<b>    autoinmunes.....</b>	<b>22</b>
	2.4.1. <i>fas</i> /APO-1/CD95.....	23
	2.4.2. <i>p53</i> o “guardián del genoma”.....	24
	2.4.3. <i>bcl-2</i> .....	25
	<b>2.5. Interés clínico.....</b>	<b>27</b>
	2.5.1. Perspectivas futuras.....	28
<b>III.</b>	<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>V.</b>	<b>INVESTIGACION Y RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
	<b>5.1. Relación del oncogen <i>bcl-2</i> con la patogenia y la actividad del</b>	
	<b>    lupus eritematoso sistémico.....</b>	<b>35</b>
	5.1.1. Síntesis de los resultados más destacados.....	40

5.1.2. Conclusiones parciales.....	41
<b>5.2. Relación de los oncogenes (<i>fas</i>, <i>bcl-2</i>) y las citocinas (IL-10, alfa-TNF) con la patogenia y la actividad del lupus eritematoso sistémico.....</b>	<b>42</b>
5.2.1. Síntesis de los resultados más destacados.....	50
5.2.2. Conclusiones parciales.....	51
<b>5.3. Importancia del oncogen <i>p53</i> y su relación con otros oncogenes (<i>fas</i> y <i>bcl-2</i>) y citocinas (IL-10 y alfa-TNF) en la patogenia y la actividad del lupus eritematoso sistémico.....</b>	<b>52</b>
5.3.1. Síntesis de los resultados más destacados.....	63
5.3.2. Conclusiones parciales.....	64
<b>VI. DISCUSION.....</b>	<b>65</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>77</b>
<b>IX. INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>90</b>

## **I. RELACION DE LAS PRINCIPALES ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO**

LES: lupus eritematoso sistémico

TNF: tumor necrosis factor

ELISA: enzimoimmunoanálisis

HCQ: hidroxicloroquina

LT: linfocitos T

LB: linfocitos B

rFas: receptor de Fas

sFas: Fas soluble

LFas: Fas ligando

SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index

## **II. INTRODUCCION**

## **2. INTRODUCCION**

El lupus eritematoso sistémico (LES), prototipo de las enfermedades autoinmunes, es una enfermedad multisistémica que se caracteriza por una alteración en la respuesta inmunológica con producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos celulares. El resultado final es la afección de múltiples órganos y sistemas<sup>1</sup>. A pesar de su complejidad, los mecanismos patogénéticos empiezan a ser comprendidos, de manera que pueden resumirse de la siguiente forma: la asociación entre una susceptibilidad genética y determinados factores ambientales desencadenaría la aparición de una respuesta inmunológica anormal, con un incremento de la función cooperadora de los linfocitos T y como consecuencia, un aumento de la actividad de los linfocitos B, con la consiguiente producción anómala de autoanticuerpos que, directamente o formando complejos inmunes, serían los responsables de la mayoría de las lesiones tisulares<sup>2</sup>.

### **2.1. LA APOPTOSIS**

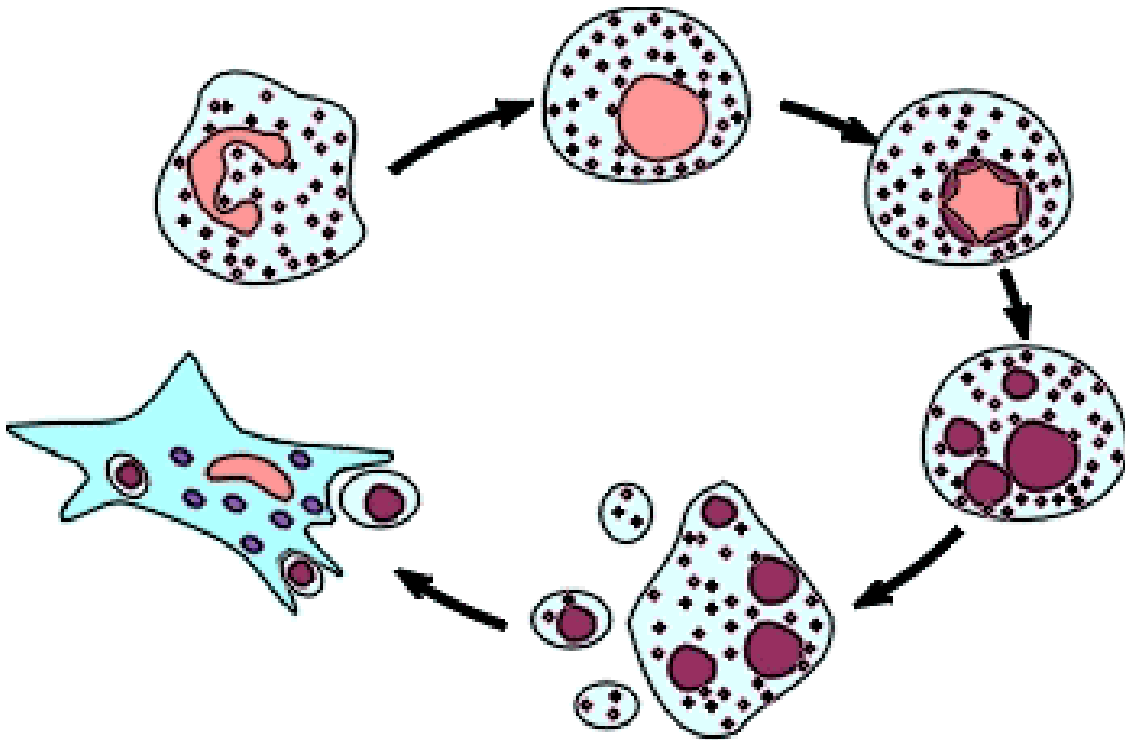
En el descubrimiento de los mecanismos patogénéticos de estas enfermedades ha sido muy importante el conocimiento de la inmunorregulación que se produce a nivel del timo en la época fetal, donde se produce un proceso de selección, mediante el cual, aquellos timocitos capaces de reaccionar contra antígenos propios son eliminados por "apoptosis"<sup>3</sup>.

La palabra apoptosis significa en griego “caída de las hojas de los árboles en otoño”. La apoptosis es un proceso fisiológico presente en todas las células del organismo. Es una forma de muerte celular programada<sup>4</sup>, es decir, que no se debe al efecto lesivo directo de un agente agresor, sino que se trata de una especie de "suicidio" de la célula indeseable para el correcto desarrollo y función de un órgano o sistema<sup>5</sup>. Esto ocurre cuando dicha célula tiene un funcionamiento inadecuado o bien, cuando ésta es, o se convierte en, nociva para el órgano en el que se encuentra. Por lo tanto, la apoptosis está involucrada en la selección del repertorio de linfocitos T y en el mantenimiento de la tolerancia, ya que es el mecanismo por el que se eliminan las células que podrían dar lugar a respuestas autoinmunes<sup>6</sup>.

### **2.1.1. Descripción del proceso de apoptosis** (Figura 1).

El núcleo y el citoplasma se condensan preservando la integridad de la membrana plasmática y de los orgánulos. La cromatina se compacta contra la membrana nuclear. La célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos. Se produce la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por los macrófagos, con lo que se impide la liberación de los contenidos celulares al espacio extracelular, evitándose de esta forma el desarrollo de procesos inflamatorios.





*Figura 1: Descripción del proceso de apoptosis.*

La base estructural de los cambios nucleares que se producen en la apoptosis depende de la “endonucleasa endógena” que rompe el DNA a nivel de las regiones nexos entre nucleosomas. Esto produce la fragmentación del DNA en más de 1 millón de unidades de DNA bicatenario de tamaño similar (200 pares de bases).

### **2.1.2. Diferencias entre necrosis y apoptosis.**

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular diferente morfológica y bioquímicamente de la necrosis.

La apoptosis está programada genéticamente en respuesta a estímulos fisiológicos o condiciones subletales; mantiene la integridad de la membrana; disminuye del tamaño celular; preserva la integridad de los orgánulos; presenta una temprana condensación de la cromatina y fragmentación del DNA en puntos muy concretos dando lugar a fragmentos oligonucleosomales que son de un tamaño muy regular. La célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos rodeados por membrana que son reconocidos y fagocitados evitando la inflamación.

Por el contrario, la necrosis es accidental o provocada por agentes letales (hipertermia, hipoxia, etc); existe pérdida de la integridad de la membrana; hay entrada de agua, aumento del tamaño celular y activación de fosfolipasas con rotura de las membranas de los orgánulos; se produce de forma tardía la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA en fragmentos grandes y de tamaño irregular. La célula libera los contenidos de los orgánulos y los restos celulares inducen la inflamación local.

### **2.1.3. Regulación de la apoptosis.**

La apoptosis está regulada por múltiples factores tanto intra como extracelulares. Veremos cómo defectos en su regulación están relacionados con la aparición de diversas patologías (pe. neoplasias, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida y enfermedades autoinmunes<sup>7</sup>, entre otras).

Entre los factores humorales están los corticoides. El complejo hormona-receptor interacciona con el núcleo, lo que provoca la transcripción de genes activadores de la apoptosis (linfocitos y timocitos). La testosterona inhibe la

apoptosis de las células prostáticas. Por esto, la orquiectomía provoca la involución prostática. La eritropoyetina inhibe la apoptosis de las células precursoras de eritrocitos. La sustancia inhibidora mülleriana (secretada por el testículo fetal) estimula la apoptosis del conducto de Müller, lo que induce el desarrollo del conducto de Wolff.

Se producen una serie de interacciones celulares que también interfieren en el proceso apoptótico. Un ejemplo de interacción por contacto es la selección neuronal en la que las neuronas que no hacen sinapsis de forma efectiva mueren por apoptosis. La interacción por interleucinas es crucial. Por ejemplo, los linfocitos citotóxicos secretan “perforinas” que destruirán el citoplasma celular, con la consiguiente secreción de “fragmentinas”, lo que estimulará la apoptosis. También secretan “linfotoxinas” que estimulan las endonucleasas. Las células Natural-Killer secretan TNF-alfa y los linfocitos T, TNF-beta.

También influyen una serie de factores intracelulares como la concentración intracelular de iones que estimulan (Ca, Mg) o inhiben (Zn) la endonucleasa (DNasa I); enzimas mediadoras de señales apoptóticas (proteincinasa C, tirosincinasas y tirosinfosfatasa); procesos oxidativos (radiaciones ionizantes) hacen que ciertas moléculas reaccionen con el O<sub>2</sub>, con la consiguiente producción de radicales libres y lesión del DNA.

Por último, dado que la orden parte de la propia célula, es esencial la transcripción de determinados genes (factores génicos). Igual que los genes implicados en la génesis de neoplasias se llaman “oncogenes”, a los implicados con las enfermedades autoinmunes se les llama “autogenes”.

#### **2.1.4. La apoptosis y las enfermedades autoinmunes sistémicas.**

Diversos grupos de estudio en el campo de las enfermedades autoinmunes han intentado aclarar algunos puntos relacionados con el papel de la apoptosis en la etiopatogenia de las enfermedades autoinmunes.

Así, estudios en el lupus del ratón han comprobado que existe un acúmulo de gran número de linfocitos T activados/memoria autorreactivos en sangre periférica. Otros trabajos observaron que los linfocitos que mueren por apoptosis son los causantes de la producción de autoanticuerpos en las enfermedades autoinmunes. Varios autores han observado que la hidroxicloroquina (HCQ) induce apoptosis en los linfocitos periféricos de forma dosis y tiempo dependiente, quizás por la inhibición de la producción de citoquinas (IL-1, IL-6, TNF). Por lo tanto, la HCQ puede ejercer su efecto antirreumático a través de la inducción de la apoptosis en los linfocitos. Este efecto proapoptótico de la HCQ se produce en todas las subpoblaciones de linfocitos T estudiadas, tanto en el LES como en los controles, aunque los linfocitos del LES muestran mayor resistencia que los de los controles a la apoptosis inducida por HCQ. Esto hacía pensar que puede existir un defecto de la apoptosis de los linfocitos en las enfermedades autoinmunes. En este sentido, diversos estudios han evidenciado que la proporción de macrófagos con material de células apoptóticas en su interior es menor en el LES que en los controles, por lo que la fagocitosis del material apoptótico puede estar reducida en el LES, con la consiguiente presentación de autoantígenos nucleares y la formación de anticuerpos contra nucleoproteínas. Los estudios

de Emlen et al concluyeron que los linfocitos recién aislados muestran bajos grados de apoptosis, no obstante, el grado de apoptosis es mayor en los linfocitos recién aislados de LES que en los de los controles y pacientes con artritis reumatoide. Los linfocitos en cultivo de los tres grupos sufren apoptosis, pero en los de pacientes lúpicos, el grado de apoptosis es 2.35 veces mayor que en la artritis reumatoide y los controles, lo que no está influido por los corticoides ni citotóxicos. Existe correlación entre el grado de apoptosis "in vitro" y la actividad de la enfermedad. Los linfocitos en el LES liberan grandes cantidades de material nucleosomal al espacio extracelular, en proporción directa con el grado de apoptosis. Por lo tanto, la apoptosis defectuosa de los linfocitos en el LES puede suministrar gran cantidad de antígenos nucleares extracelulares con la consiguiente respuesta inmune y la formación de inmunocomplejos. Concluyen que los resultados obtenidos apoyan la teoría de que, anomalías en la apoptosis pueden contribuir en la patogénesis del LES.

## **2.2. APOPTOSIS E INTERLEUCINAS:**

Las citocinas son un grupo de sustancias producidas por diversos tipos celulares que intervienen como mediadores de las respuestas inmunológica e inflamatoria. Con la designación de “citocinas” se incluye un grupo de proteínas y péptidos que actúan como reguladores humorales sistémicos a muy bajas concentraciones, modulando la actividad de un amplio número de tipos celulares. A partir de la década de los 80, una vez conseguida su clonación y con la disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos para cada citocina, se ha realizado un paso decisivo para su conocimiento. No obstante, las consideraciones referentes a la actividad de las citocinas que se exponen a continuación, dificultan la interpretación de cuál es el significado clínico derivado de la actividad de estas sustancias.

### **2.2.1. Consideraciones sobre la actividad de las citocinas:**

Las citocinas actúan a través de receptores de membrana, que son proteínas de transmembrana capaces de convertir una señal extracelular en intracelular. Además, estas proteínas receptoras pueden solubilizarse, pudiendo actuar como agonistas o antagonistas de sus citocinas.

Las citocinas tienen mecanismos de acción propios y característicos. Su acción puede ser redundante o coincidente (pe. IL-1, IL-6, TNF-alfa); pleitrópica sobre diversos tejidos con múltiples efectos biológicos; sinérgica o agonista; antagonista. Además, su acción puede ser dependiente de diversas circunstancias contextuales como su concentración, estado de la célula sobre

la que actúan, presencia de otras citocinas, secuencia temporal de actuación con respecto a otras citocinas, etc.

### **2.2.2. Las citocinas y las enfermedades autoinmunes.**

La apoptosis está involucrada en la selección del repertorio de linfocitos T y en el mantenimiento de la tolerancia, ya que es el mecanismo por el que se eliminan las células que podrían dar lugar a respuestas autoinmunes.

En esta dirección, han proliferado en los últimos años, estudios que han relacionado la implicación de diversas citocinas en la regulación de la apoptosis de estas células autorreactivas, y por ende, en diferentes enfermedades de carácter autoinmunitario (Figura 2).

La interleucina-1, secretada por los macrófagos, tiene una actividad proinflamatoria. La interleucina-2 se libera al suero en forma de Receptor Soluble de IL-2 tras la activación linfocitaria (LTh1). El Receptor Soluble de IL-2 se detecta en suero en individuos sanos, y sólo se detecta en niveles superiores a los normales en enfermedades con excesiva activación linfocitaria. Actúa promoviendo la proliferación de los linfocitos T. La interleucina-4, secretada por los LT activados, promueve la activación, proliferación y diferenciación de los LB, así como la inducción de LTh2 que regulan la inmunidad humoral. La interleucina-5, liberada también por los LT activados, además de promover la activación, proliferación y diferenciación de los LB, es el principal factor regulador de la eosinofilia (de aquí la eosinofilia en algunos tumores). La interleucina-6, secretada por los macrófagos activados, monocitos, fibroblastos y células endoteliales, regula la respuesta

inmunológica, la hematopoyesis y las reacciones de fase aguda. El interferón gamma o tipo II que es liberado por los LT activados y linfocitos Natural Killer, inhibe la proliferación de LTh2, aumenta la actividad citolítica de las células T citotóxicas incrementando la expresión del receptor de IL-2.

La interleucina-10, producida por los linfocitos LTh2, es coestimulador del crecimiento de varias células hematopoyéticas, incluyendo LB y LT, inhibe la síntesis de IFN-gamma e IL-2 por los LT; inhibe la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF-alfa por los macrófagos, lo que le confiere un efecto antiinflamatorio. Varios estudios muestran que la IL-10 contribuye a inhibir la apoptosis de las células autorreactivas en los pacientes lúpicos. Además, la expresión de IL-10 se ha relacionado con la actividad de la enfermedad.

La diferente actividad de TNF-alfa o caquectina sobre varios tipos celulares depende de la distinta expresión o regulación de sus receptores, aunque, en líneas generales tiene una actividad antitumoral (sinergia con INF-gamma), de mediador en el shock séptico y efecto pro-inflamatorio. TNF-alfa es secretada por monocitos, macrófagos y linfocitos, puede interferir en la apoptosis de los linfocitos autorreactivos de los pacientes lúpicos.



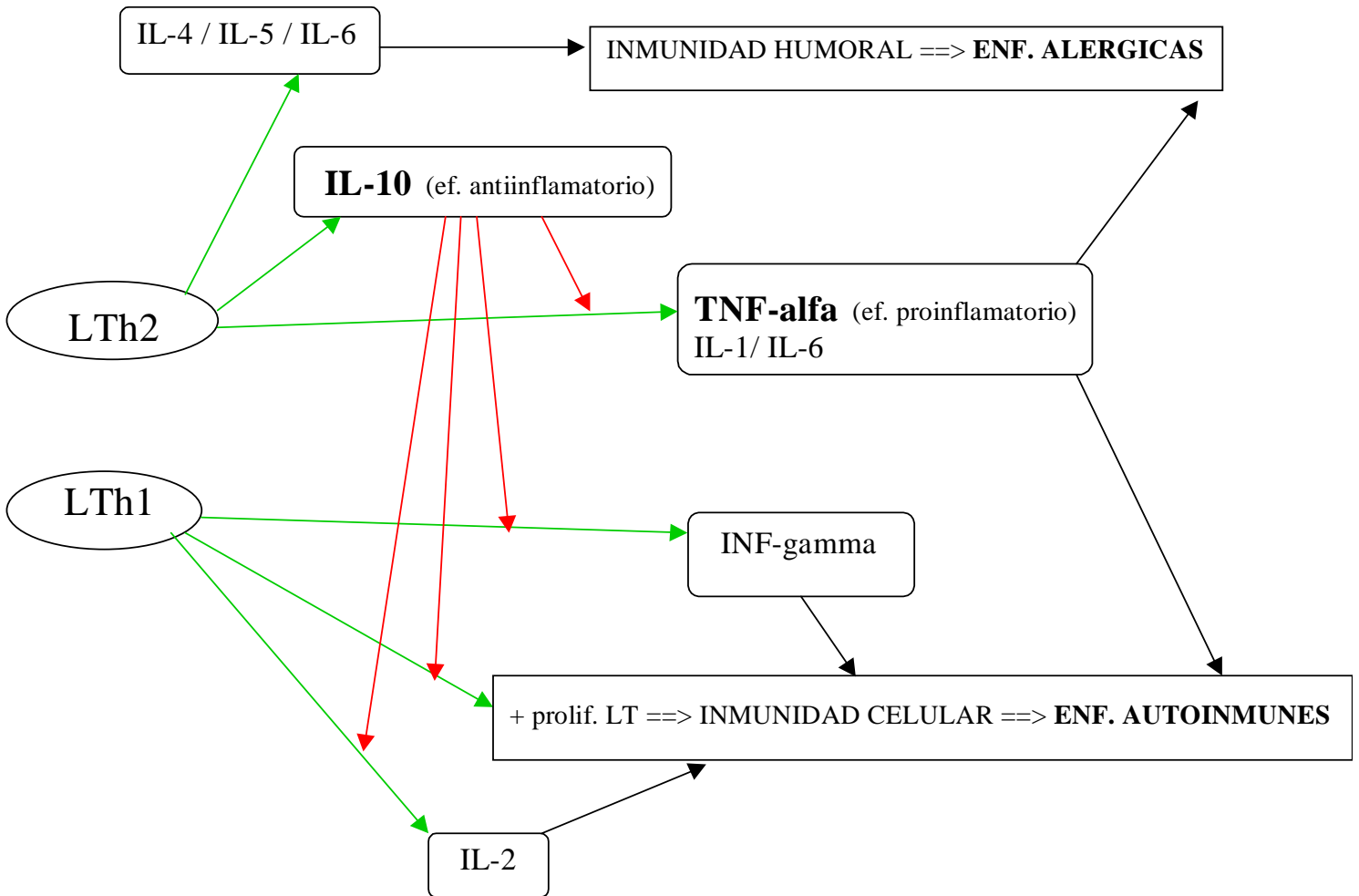


Figura 2: esquema de las principales funciones de las interleucinas relacionadas con la etiopatogenia de la autoinmunidad.

### 2.3. APOPTOSIS Y ONCOGENES

La investigación sobre alteraciones de la apoptosis se ha dirigido últimamente a intentar detectar anomalías en los genes implicados en el control y regulación de este proceso. Se han identificado en el ser humano algunos genes cuya transcripción parece ser crucial en este proceso: *fas*, *p53*, *bcl-2*, entre otros<sup>8</sup>.

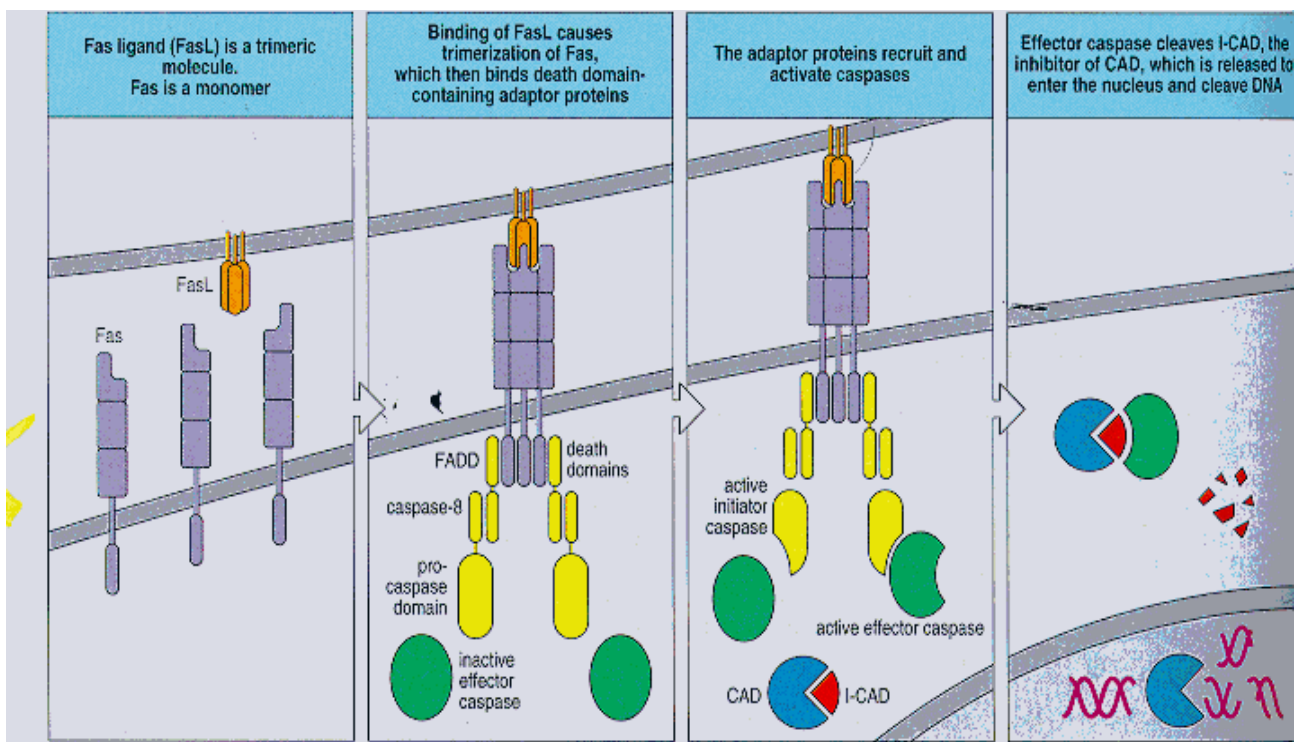
*El gen fas/APO-1/CD95* es un inductor de apoptosis en los linfocitos T y B ya activados. A nivel de las enfermedades autoinmunes, el gen *fas*, también llamado *APO-1*, es el que más expectativas despertó inicialmente<sup>9-10</sup>. Este gen codifica una proteína transmembrana de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, cuya estimulación conduce a la apoptosis de linfocitos T y B previamente activados<sup>11</sup>. Teniendo en cuenta que la apoptosis constituye un mecanismo que evita una proliferación excesiva y descontrolada de células implicadas en la respuesta inmune, no debe extrañar que una de las señales que estimulan la apoptosis en los linfocitos sea la propia activación de éstos.

Así pues, la llamada "apoptosis inducida por la activación"<sup>12</sup> se desencadena por la estimulación de las inmunoglobulinas de membrana en los linfocitos B, y en los LT por la interacción con su receptor (TCR) a cargo de antígenos o, experimentalmente, de otras sustancias. Esta señal es transmitida a un segundo mensajero intracelular (calcio, protein-kinasa C, tirosin-kinasa) que actúa a nivel del núcleo y ocasiona la transcripción de determinados genes<sup>13</sup>.

La expresión de estos genes determina la sobreexpresión del receptor de Fas (rFas) y la inducción del Fas ligando (Lfas), lo que hace que se active el proceso de apoptosis en dicha célula<sup>14</sup>. (Figura 3)

Por lo tanto, la apoptosis inducida por la activación se desencadena por la reestimulación de los LB por sus inmunoglobulinas de superficie o por la reinteracción antigénica con los receptores de los LT ya activados. Esto conlleva a la transcripción de anti-oncogenes por los mecanismos apoptóticos descritos.

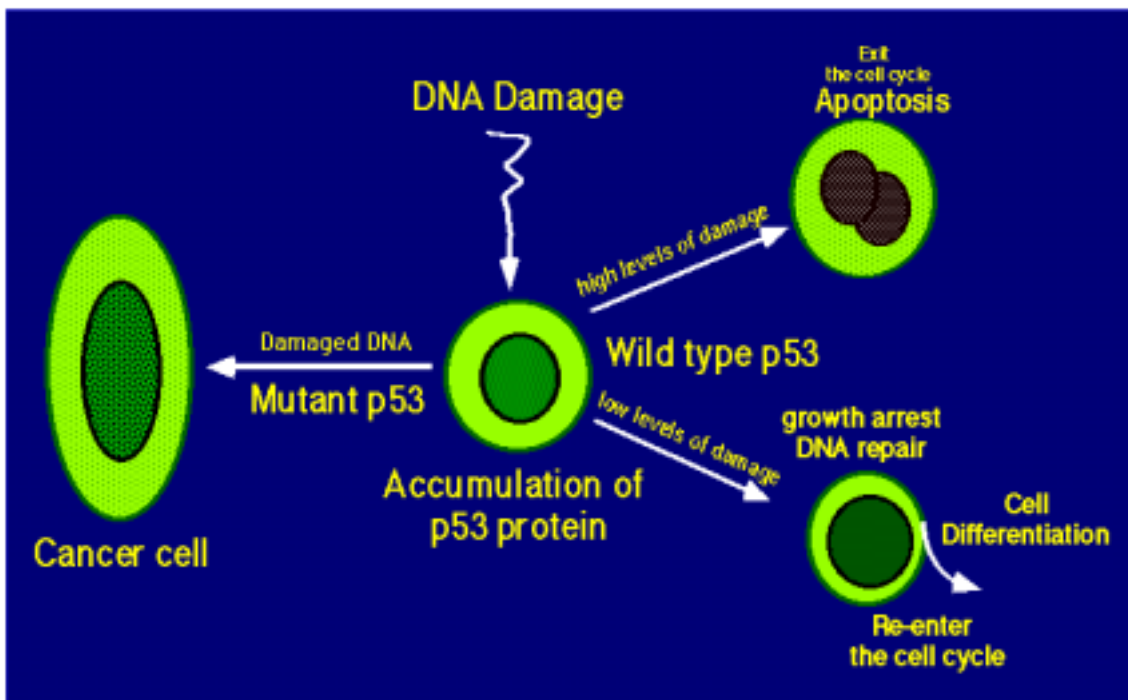
Este fenómeno tiene importancia en la autotolerancia (selección tímica negativa), en la tolerancia inmunológica (desensibilización), y en el mecanismo de “feed-back” para evitar respuestas inmunes exageradas (fenómenos autoinmunitarios y síndromes linfoproliferativos).



*Figura 3: Mecanismo de acción de Fas. Se puede observar el receptor Fas (rFas, proteína transmembrana), estimulado por la unión del Fas ligando (LFas), lo que activa el sistema de caspasas, concluyendo en la activación de la endonucleasa (CAD) encargada de fragmentar el material genético en nucleótidos de tamaño muy regular. Se puede observar como el Fas soluble (sFas) que es la parte extracelular del rFas, se*

*desprendería del resto de la proteína debido a defectos genéticos o a la acción de otras citocinas o oncogenes.*

El gen *p53* también llamado “guardián del genoma”, se encarga de estimular la apoptosis cuando hay un daño importante del DNA que no podrá ser reparado (Figura 4). El *p53* es un oncogén recesivo, localizado en el brazo corto del cromosoma 17. Sus alteraciones se han relacionado con el origen de diversas neoplasias (pe. colon, mama, pulmón, etc). Su función parece estar asociada principalmente a la regulación del ciclo celular mediante el bloqueo del paso de la fase G1 a S. De esta forma, la célula sufre apoptosis si existen alteraciones en el DNA de difícil reparación.



*Figura 4: Mecanismo de acción de p53*

El protooncogén *bcl-2* inhibe habitualmente la apoptosis, de manera que, en caso de una sobreexpresión anómala, permitirá una proliferación celular excesiva con el posible desarrollo de neoplasias (Figura 5). Bcl-2 fue inicialmente identificada por su participación en la mayoría de linfomas no Hodgkin de células B, donde la traslocación inter cromosomal t(14:18) yuxtapone el gen *bcl-2* con el locus de las inmunoglobulinas, lo que lleva a la transcripción de altos niveles de *bcl-2*, con el consiguiente incremento de la supervivencia celular.

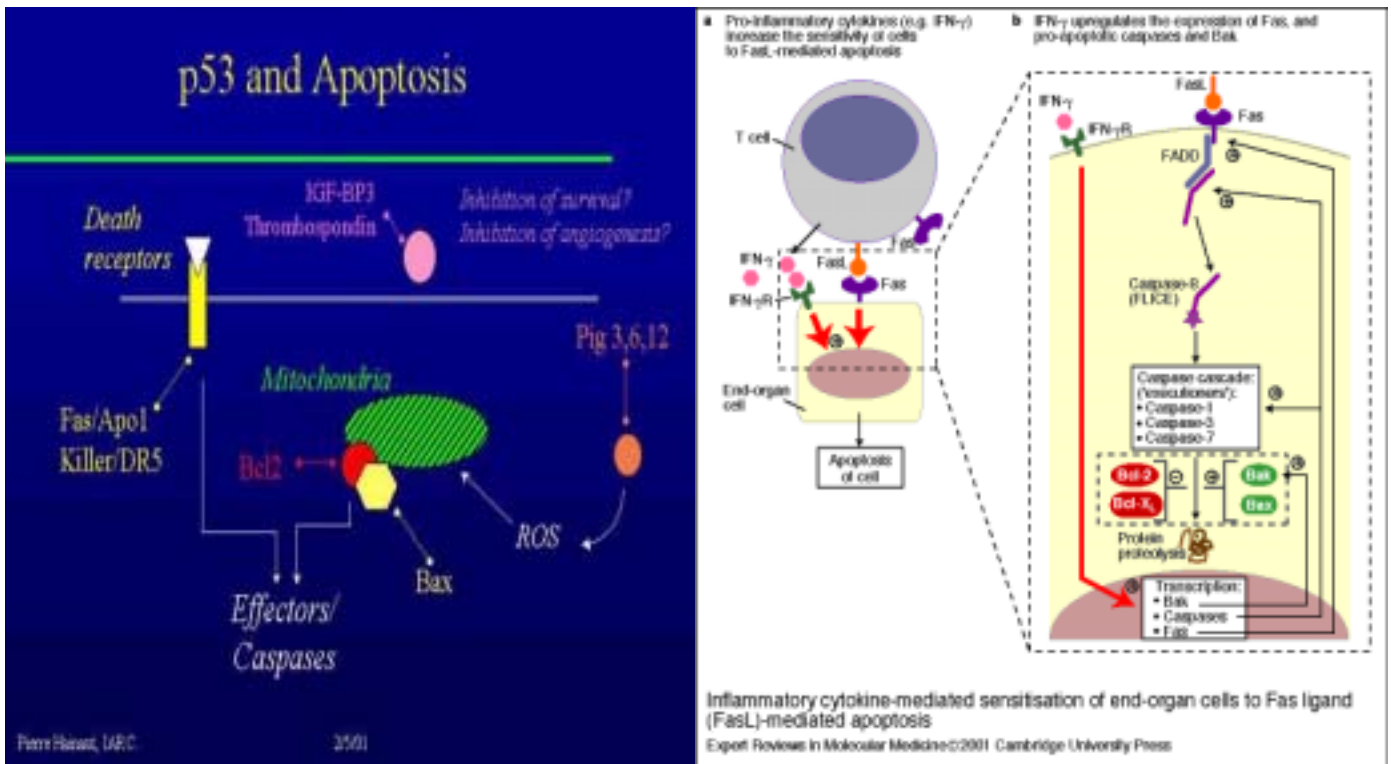


Figura 5: Mecanismo de acción de *bcl-2*. En el esquema arriba a la izquierda, el *bcl-2* en la membrana de la mitocondria (proteína intracitoplasmática). A la derecha se ve como el *bcl-2* actúa inhibiendo la vía apoptótica del Fas, a través de inhibir la activación de la endonucleasa (CAD) encargada de la fragmentación del DNA.

## 2.4. LOS GENES REGULADORES DE LA APOPTOSIS Y LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

Además de la conocida implicación que tienen las mutaciones o alteraciones de los genes reguladores de la apoptosis en la génesis de neoplasias, se sospecha que cambios en la expresión de los mismos podrían desempeñar algún papel en la patogenia de las enfermedades autoinmunes, al favorecer la proliferación de determinadas poblaciones celulares de efecto autorreactivo<sup>3</sup>. La investigación sobre alteraciones de la apoptosis se ha dirigido últimamente a intentar detectar anomalías en los genes implicados en el control y regulación de este proceso<sup>15-19</sup>. Se han identificado en el ser humano algunos genes cuya transcripción parece ser crucial en este proceso<sup>20</sup>: *p53*, *rb*, *c-myc*, *bcl-2*, *ras*, *bcl-x*, *fas*, *TRPM-2* y *mdm2*. (Figura 6)

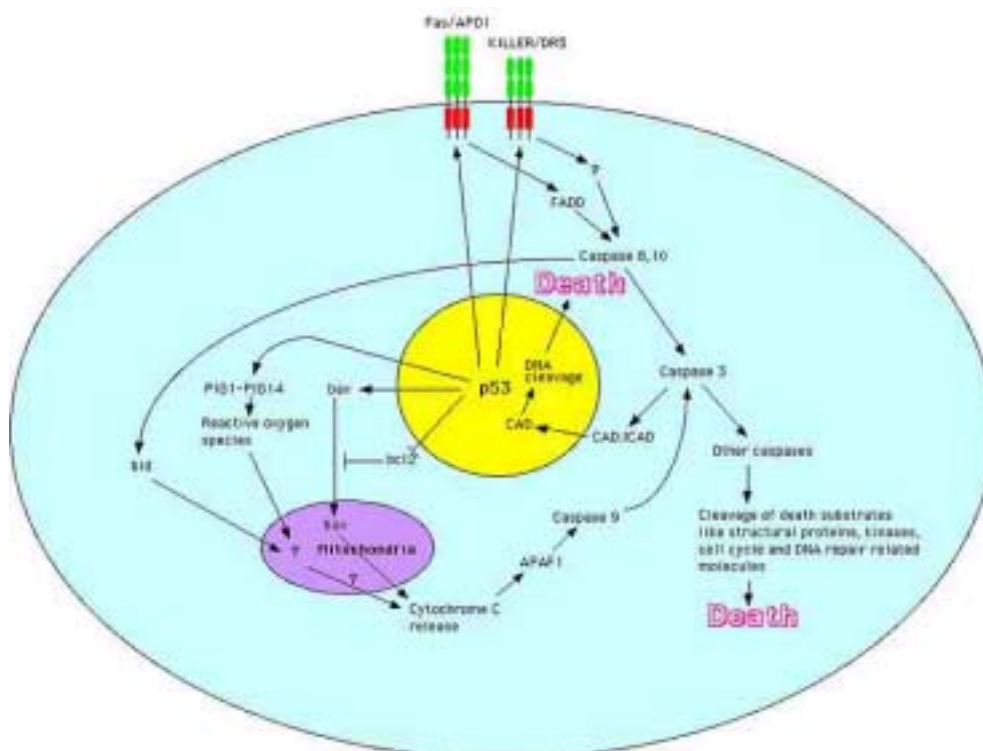


Figura 6: Interrelación entre los distintos oncogenes.

### **2.4.1. *fas*/APO-1/CD95.**

El gen *fas* tiene la función de inductor de apoptosis en los linfocitos T y B una vez activados<sup>21</sup>. El interés que ha despertado la proteína que codifica *fas* (rFas) deriva de diversos estudios realizados con ratones MRL/lpr, los cuales presentan una mutación genética que hace que sus linfocitos carezcan de Fas de membrana (rFas)<sup>22</sup>. Estos linfocitos, previamente activados con anti-CD3-TCR o con antígeno, no sufren apoptosis ante una nueva estimulación con dichas sustancias, es decir, no presentan muerte celular programada inducida por la activación. Este fallo en la apoptosis hace que en el timo de estos ratones se produzca el "escape" hacia la sangre periférica de clonas autoinmunes. Los ratones desarrollan un cuadro clínico con manifestaciones autoinmunes generalizadas similares al LES, denominado "lupus-like". Todo ello parece indicar que la presencia de rFas es necesaria para la regulación de la respuesta inmune y que, en caso de ser deficitario, pueden aparecer clonas celulares que escapen al proceso de selección tímica y que induzcan procesos autoinmunes generalizados.

Se ha descrito que los pacientes lúpicos presentan valores elevados de una forma soluble de Fas en el plasma. Este Fas-soluble (sFas) interaccionaría con su ligando (LFas) e impediría la unión de éste al Fas de membrana (rFas), lo que inhibiría la apoptosis linfocitaria y favorecería así la supervivencia de las células autorreactivas<sup>23-25</sup>.

Algunos estudios han intentado implicar diferentes citocinas en la regulación de la expresión y función de estos oncogenes en el entramado que supone la regulación en general de la apoptosis y en su relación con la etiopatogenia de

las enfermedades autoinmunes. En este sentido, diversos estudios sugieren que TNF-alfa puede interferir en la apoptosis de los pacientes lúpicos inhibiendo la función del rFas.

#### **2.4.2. p53 o “guardian del genoma”.**

Este gen sólo estimula la apoptosis cuando hay un daño importante del DNA que no podrá ser reparado. Sus alteraciones se han relacionado con neoplasias (pe. colon). Su función está controlada por el gen *rb*.

Los genes supresores de tumor, como *p53*, son activadores de apoptosis, de forma que una mutación que los convierta en disfuncionantes tendrá un efecto similar. Las mutaciones del *p53* parecen implicadas en la patogenia de numerosos tumores sólidos, pero su papel en las enfermedades autoinmunes, por el momento, se desconoce<sup>26-27</sup>. Takahashi et al objetivaron que las mutaciones de *p53* producen un aumento de la vida media de la proteína mutada, lo que produce un acúmulo de p53 en las células transformadas.

Kovacs et al observaron que los anticuerpos anti-p53 pueden ser identificados en el suero de los pacientes con LES y con otras enfermedades autoinmunes. Los linfocitos T inmaduros autorreactivos son eliminados o anergizados a su paso por el timo. En sangre periférica, los linfocitos activados son eliminados por apoptosis inducida por la activación (o mediada por Fas). Pacientes afectos de ciertas malignancias que presentan acúmulos de p53 mutado en sus células tumorales son portadores de anticuerpos anti-p53 circulante. Encontraron anticuerpos anti-p53 en el 32% de los pacientes lúpicos, frente al 15% de pacientes no lúpicos (2 Sd. Sjogren y 1 esclerodermia sistémica) y en el 0% de



los controles sanos. Las determinaciones seriadas de anticuerpos anti-p53 en un paciente durante 3 años no mostraron correlación con la actividad de la enfermedad. No han encontrado mutaciones en los exones 5-10 del gen *p53* de los linfocitos T de los pacientes lúpicos estudiados, por lo que concluyen que la presencia de Ac anti-p53 no es el resultado de mutaciones en el gen *p53* de los linfocitos T, aunque, es posible que la mutación se encuentre en otras células o en una región no testada del gen. Los métodos comerciales para la detección de *p53* pueden reconocer tanto las proteínas mutadas como las vírgenes en los linfocitos activados, por lo que es posible que, tras la activación celular ocurra un cambio conformacional de la proteína que resulte en la formación de un neoantígeno. Esto hace pensar que es posible que un cambio conformacional de *p53* en los linfocitos activados del LES pueda llevar a la sobreproducción de anticuerpos anti-p53, aún en ausencia de mutaciones del gen *p53*.

### **2.4.3. *bcl-2*.**

El protooncogen *bcl-2* inhibe habitualmente la apoptosis, de manera que, en caso de una sobreexpresión anómala, permitirá una proliferación celular excesiva con el posible desarrollo de neoplasias (sobretudo de estirpe hematológica)<sup>28-30</sup>. No obstante, el papel de *bcl-2*, bien conocido en la etiopatogenia de determinadas leucemias y linfomas B, está aún por definir en las enfermedades autoinmunes en humanos. Al parecer, *bcl-2* se halla moderadamente sobreexpresado en los linfocitos de pacientes con LES, hecho que, si bien no puede considerarse específico de esta enfermedad, sí que habla en favor de una disregulación de la apoptosis en su patogenia<sup>31-33</sup>.

Algunos autores han encontrado un incremento de la apoptosis “in vitro” de los linfocitos en los pacientes lúpicos. Se cree que Bcl-2 tiene un efecto regulador negativo sobre la apoptosis Fas-dependiente. En fase de actividad, se produciría un aumento de la apoptosis de estos linfocitos producido por un incremento mayor del Fas que del Bcl-2. Esto lleva a un acúmulo de cuerpos apoptóticos que contienen fragmentos de DNA. Estas partículas son captadas por los macrófagos, llegándose a colapsar este sistema de depuración. Es entonces cuando se formarían diversos autoanticuerpos (anti-DNA) con los consiguientes fenómenos autoinmunes.

Otros autores que creen que existe una inhibición de la apoptosis de determinadas clonas de linfocitos que tienen efecto autorreactivo, y que deberían haber sido eliminados durante el proceso de selección tímica. Esta inhibición se acompaña de una sobreexpresión de Bcl-2 en los linfocitos de estos pacientes lúpicos<sup>34</sup>, aunque no está clara su participación directa en dicho fenómeno<sup>33</sup>.

Diversos estudios muestran que la IL-10 contribuye a inhibir la apoptosis de las células autorreactivas en los pacientes lúpicos, a través de aumentar la expresión de Bcl-2 en estas células. Además, la expresión de IL-10 y Bcl-2 se ha relacionado con la actividad de la enfermedad.

## 2.5. INTERES CLINICO.

Como hemos expuesto con anterioridad, en la etiopatogenia de las enfermedades autoinmunes parece estar implicada una alteración en los mecanismos de apoptosis. Los estudios preliminares realizados no han demostrado si estas alteraciones se producen a nivel genómico (mutación, delección, amplificación), a nivel transcripcional o a nivel de la expresión de las proteínas implicadas en la apoptosis, bien en la membrana linfocitaria o a nivel soluble. El estudio de la existencia o no de estas alteraciones y su caracterización puede ayudar, sin duda, a definir mejor la patogenia tanto del LES como de otros procesos autoinmunes en el hombre. Ello no solamente tiene interés en el plano teórico, sino también por las implicaciones terapéuticas que podría tener la restauración del control de la apoptosis en los casos en que estuviese alterada. A este respecto, es interesante indicar que desde hace tiempo se vienen empleando, de forma no premeditada, fármacos con esta propiedad, como los glucocorticoides y los inmunosupresores. Se cree que los glucocorticoides tienen un efecto inductor de la apoptosis en los linfocitos<sup>35</sup>. No obstante, parece ser que los linfocitos más inmaduros (los doble negativos o CD4-/CD8-) son precisamente los que serían más resistentes a la acción de los esteroides, y, quizás por ello, han evitado la apoptosis inducida por los glucocorticoides endógenos durante el proceso de selección negativa en el timo<sup>36</sup>. Por ello, el principal problema radica en su inespecificidad de acción, que da lugar a numerosos efectos no deseados al afectar a células no implicadas en el proceso patológico. Por lo tanto, el objetivo en los próximos

años debe ser hallar terapias que actúen selectivamente sobre las células autorreactivas implicadas en las enfermedades autoinmunes.

Las investigaciones sobre la utilización de futuros tratamientos deberían ir encaminados a inhibir la apoptosis cuando está estimulada (pe. SIDA, isquemia); y estimular la apoptosis cuando está inhibida (pe. enfermedades autoinmunes, neoplasias).

### **2.5.1. Perspectivas futuras.**

a) A nivel de factores solubles (pe. sFas). El posible papel de la plasmaféresis para depurar el plasma de estos factores solubles.

b) A nivel de receptores de membrana (Fas, bcl-2, p53, etc). Ya hemos visto cómo los glucocorticoides y citostáticos parecen tener un efecto inductor de la apoptosis en los linfocitos. La ciclosporina A, ciclofosfamida y metrotexate son los más utilizados, de forma empírica, en la mayoría de pacientes afectados de enfermedades autoinmunes.

En este sentido, se ha visto como la enterotoxina B de *Staphilococcus aureus* (superantígenos) elimina las células autorreactivas de los ratones MRL-lpr/lpr, con la consiguiente mejoría de los parámetros de autoinmunidad. Se ha ensayado también con globulinas antilinfocíticas y antitimocíticas, radiaciones ionizantes, mediadores celulares (ca, mg, zn, cinasas) y sistemas red-ox.

Distintos preparados nutritivos antiapoptóticos se han empleado, por ejemplo, para combatir la diarrea inducida por quimioterápicos, HIV o radiaciones. Anticuerpos monoclonales anti-TNF como proteína pro-apoptótica se han utilizado de forma experimental para combatir el shock séptico.

c) A nivel de manipulación genética. Dado que, la proliferación de células autorreactivas es el resultado de defectos en la apoptosis, y que, algunas alteraciones de la apoptosis son consecuencia de alteraciones cromosómicas puntuales, es lógico pensar que la terapia genética puede ser una estrategia terapéutica en el futuro.

Por ejemplo, la introducción del gen normal en un retrovirus que infectará a la célula diana. Vectores retrovirales con la forma normal de *p53* penetran en las células de determinados tumores sólidos, con los consiguientes efectos terapéuticos por apoptosis. Por otro lado, la introducción de *fas* normal en ratones MRL-lpr/lpr, podría conllevar la corrección de los fenómenos autoinmunes.

El LES, enfermedad autoinmune por excelencia, se presenta, por tanto, como una entidad en la que el estudio de la apoptosis puede contribuir de forma valiosa a la comprensión de su patogenia y al desarrollo de tratamientos adecuados.

### **III. HIPOTESIS**

### **3. HIPOTESIS**

Existen evidencias de que la alteración en los mecanismos apoptóticos están implicados en la patogenia y la actividad de las enfermedades autoinmunes sistémicas, de las cuales, el LES es la más representativa. Estas posibles anomalías pueden residir a nivel de los genes y de las proteínas que de ellos se derivan. Así, puede estar alterado a nivel del genoma (DNA) (mutaciones, deleciones o translocaciones), de la transcripción genética (RNAm), la expresión de las proteínas que codifican estos oncogenes (receptores) y, por último, a nivel de la estimulación de los receptores (ligandos, fracciones solubles de los receptores, citocinas).

Los oncogenes que parecen estar más implicados en la patogenia del lupus eritematoso sistémico son *bcl-2*, *fas* y *p53*. Asimismo, las citocinas que pueden jugar un papel relevante en la disregulación de la apoptosis de los linfocitos en los pacientes lúpicos son la IL-10 y el TNF-alfa.

Con los trabajos de la presente tesis doctoral nos propusimos corroborar y aclarar algunos de estos puntos, así como intentar aportar algunos datos en relación a la patogenia y la actividad del LES.

## **IV. OBJETIVOS**



#### **4. OBJETIVOS**

1. Determinar la implicación de los oncogenes (*bcl-2*, *fas* y *p53*) y las citocinas (IL-10 y TNF-alfa) en la disregulación apoptótica que presentan los pacientes con lupus eritematoso sistémico.
2. Estudiar la interrelación que existe entre los distintos oncogenes y citocinas implicadas en el mecanismo de regulación de la apoptosis en los pacientes con lupus eritematoso sistémico.
3. Analizar la relación de las posibles disregulaciones de los elementos que participan en la apoptosis con la actividad de la enfermedad lúpica.

## **V. INVESTIGACION Y RESULTADOS**

**5. 1. RELACION DEL ONCOGEN *bcl-2* CON LA PATOGENIA Y  
LA ACTIVIDAD DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

## BCL-2 Oncogene (B Cell Lymphoma / Leukemia-2) Levels Correlate with Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity

C. MIRET, J. FONT, R. MOLINA, M. GARCIA-CARRASCO, X. FILELLA, M. RAMOS, R. CERVERA A. BALLESTA and M. INGELMO

Systemic Autoimmune Diseases Unit and <sup>1</sup>Laboratory of Clinical Biochemistry, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

**Abstract.** Objective: Bcl-2 translocation or overexpression is found in many types of malignancy, possibly through alteration of the apoptosis mechanism. It has also been suggested that similar apoptotic alterations may be important in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). It is believed that a process of apoptosis at the stage of maturation or differentiation of lymphocytes may be related to the beginning of an autoimmune event, due to the non-elimination of autoreactive lymphocytes. The aim of this study is to test bcl-2 antigen expression in human SLE peripheral blood and to analyze its relationship with disease activity. Materials and methods: Serum levels of bcl-2 were studied by enzyme-linked immunosorbent assay in whole blood samples in 68 patients with SLE and its correlation with disease activity according to SLE disease activity index (SLEDAI). Results: No significant differences were found in bcl-2 levels between all SLE patients and controls. We observed increased levels of bcl-2 in active SLE patients in relation to inactive ( $p=0.0003$ ) and controls ( $p=0.02$ ). Our results show a significant correlation between bcl-2 levels and SLEDAI values ( $R=0.46$ ,  $P<0.001$ ). Conclusions: These results suggest that bcl-2 levels are related to disease activity and that this protein may play a role in the pathogenesis of SLE.

The proto-oncogene bcl-2 encodes a 25-Kd protein which is located at the inner membrane of the mitochondria, the endoplasmic reticulum, and the nuclear membrane (1) of tissues characterized by apoptotic cell death (2). This regional distribution suggests that bcl-2 is regulated differentially during T-cell maturation and is involved in the survival of T cells. Bcl-2 was originally identified through its involvement in the majority of non-Hodgkin B-cell lymphomas where a t(14;18) interchromosomal translocation juxtaposes the bcl-2

gene with the immunoglobulin heavy chain locus, leading to transcription of high levels of bcl-2 which enhance cell survival (3). High levels of bcl-2 expression are found in many types of malignancy (4). Furthermore, based on findings in murine SLE models, several studies reveal links between bcl-2 oncogen and autoimmunity. Polyclonal B cell activation and the production of antibodies against a variety of autoantigens are classic features of systemic lupus erythematosus (SLE). The survival of lymphocytes is carefully regulated in order to maintain the dynamic balance between host defence and aggression towards self. Autoreactive B cells are found in healthy individuals, but their numbers are probably regulated by cell death, after a few days, in the absence of proliferative stimuli. The process which achieves this-regulation is known as apoptosis or programmed cell death, which is crucial in the establishment of self-tolerance. Recently, much attention has been devoted to the role of apoptosis in the pathogenesis of autoimmune diseases, especially SLE. It has been postulated that in SLE, apoptosis dysfunction could result in the inappropriate longevity of autoreactive B cells, allowing autoantibodies to reach pathogenic thresholds, leading to the breakdown of self-tolerance. Several lines of evidence suggest that defective apoptosis of autoreactive lymphocytes might be involved in the pathogenesis of SLE (5). Overexpression of bcl-2 in transgenic mice extends the survival of B cells (6), production of autoantibodies (7), B cell memory (8) and inhibition of clonal deletion of self-reactive B lymphocytes (9), and favours the development of a disease that resembles SLE. Different groups of investigators (10-14) found the apoptosis-inhibiting protein bcl-2 expressed in higher intensity, whereas other groups (15-16) did not detect any differences in bcl-2 expression of lymphocytes from human SLE compared with normal controls.

The aim of the present study was to investigate a possible up-regulation of bcl-2 levels in SLE and its relationship with disease activity, and to evaluate the possible influence of several clinical and biological parameters on bcl-2 levels.

### Materials and Methods

**Subjects.** Heparinized venous peripheral blood was obtained from 68 SLE patients (ages: 17-68 years, mean: 38+/-15) who were diagnosed

Correspondence to: Dr. Rafael Molina, Laboratorio de Bioquímica Clínica, Unidad de Estudio del Cáncer, Hospital Clinic i Provincial (esc 7, piso 5<sup>o</sup>), C/ Villarreal 170, 08036-Barcelona, Spain. Tel: 227 54 00 (ext. 5518). Fax: 227 54 54.

**Key Words:** Activity, apoptosis, bcl-2, glucocorticoids, systemic lupus erythematosus.

Table I. *Bcl-2* levels on peripheral blood from active and inactive SLE patients and normal controls.

BCL-2	n	mean±SD (U/ml)	median±ES (U/ml)	Rank (U/ml)
Controls <sup>1</sup>	30	21±7.1	20±1.3	11.6-41.7
SLE	68	21.8±10.5	19±1.3	7-53
Active SLE <sup>1,2</sup>	23	28.9±12.7	28±2.7	7-53
Inactive SLE <sup>2</sup>	45	18.2±7	16±1	8.1-30

1 → controls - active SLE;  $p = 0.02$

2 → inactive SLE - active SLE;  $p = 0.0003$

according to the American College of Rheumatology revised criteria for SLE (17). Using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score (18), 68 patients were divided into two groups: 45 had an inactive stage (SLEDAI score < 8) and 23 had an active stage (SLEDAI ≥ 8), similar to criteria proposed by other authors (19-21). Blood was obtained from 30 sex- and age-matched healthy volunteers.

**Preparation of samples.** blood samples were obtained by venous puncture in the early morning. Subsequently 250 microlitres of whole blood sample were mixed with 50 microlitres of lysis reagent and the supernatant frozen at -70°C.

**Bcl-2 determination by enzyme-linked immunosorbent assay in whole blood samples.** Levels of bcl-2 oncoprotein were determined using a commercial by available technique, Endogen Human bcl-2 Elisa (Endogen Inc, Woburn, USA). In summary, 50 microlitres of undiluted lysate or standards (between 11 and 360 U/ml) and 50 microlitres of FITC labeled antibody against bcl-2 are pipetted in a bcl-2 precoated with mouse monoclonal antibody against human bcl-2 protein stripwell plate and incubated 3 hours at room temperature. After washing three times with phosphate buffered saline, 100 microlitres of sheep antibody HRP labelled against anti-FITC IgG were pipetted into the solution and incubated 1 hour at room temperature. All wells were washed three times with phosphate buffered saline and 100 microlitres of TMB substrate solution (tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide) were included and incubated 30 minutes at room temperature protected from light. Then 100 microlitres of stop solution (0.18 M sulfuric acid) were pipetted to stop the reaction and the absorbance was read at 450 nm versus the substrate blank. The amount of bcl-2 in each sample was interpolated from the absorbance value (Y axis) to the bcl-2 concentration (X axis) using the standard curve.

**Statistics.** Statistical significance was assessed by the Mann-Whitney U test for nonparametric data and by the McPearson correlation coefficient for parametric data. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .

## Results

The expression of bcl-2 antigen on peripheral blood from active and inactive SLE patients and normal controls was examined in a peripheral blood lysate. The values obtained are expressed in Table I. No significant differences were found in bcl-2 levels between all SLE patients and normal

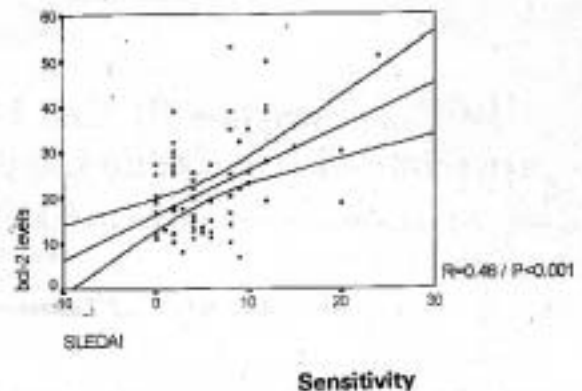


Figure 1. Correlation between *bcl-2* levels and SLEDAI values.

controls. To determine whether bcl-2 levels might be related to clinical activity, these levels were compared between SLE patients with active disease (arbitrarily defined as a SLEDAI score of ≥ 8) and those with less active disease (SLEDAI score of < 8). We observed increased levels of bcl-2 in the active SLE subpopulation as compared to inactive patients ( $p=0.0003$ ) and normal controls ( $p=0.02$ ). Interestingly, we observed a significant correlation between bcl-2 levels and SLEDAI values ( $R=0.46$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 1). Lymphocyte counts were significantly correlated with bcl-2 levels ( $R=0.38$ ,  $p=0.001$ ), but when we evaluated bcl-2 levels from active or inactive patients separately, we observed that in patients with active disease, bcl-2 levels were not related to the number of lymphocytes ( $R=0.23$ ,  $p=0.29$ ) (Figure 2).

## Discussion

A general characteristic of lupus mice and human SLE is the accumulation of large numbers of presumably self-reactive activated cells (22). It has been widely suspected that a defect in the ability to eliminate self-reactive T or B cells underlies at least some of the immunological changes in autoimmune disorders (23). Moreover, phagocytosis of apoptotic cell material may be decreased in SLE patients, probably leading to a presentation of autoantigens which trigger an auto-antibody response to nucleoproteins (24-26). Several authors have found a significant increase in the number of apoptotic cells on freshly isolated lymphocytes from SLE and, in tissue culture, the rate of apoptosis of lymphocytes derived from SLE patients was faster than that of controls, which could lead to the phagocytic system being swamped by apoptotic cell bodies. Thus, intracellular constituents, such as apoptotic DNA fragments, would be presented to immunocompetent cells, leading to the formation of immune complexes and autoantibodies against intracellular particles such as dsDNA (27-28).

The *bcl-2* gene was first characterized as the activated

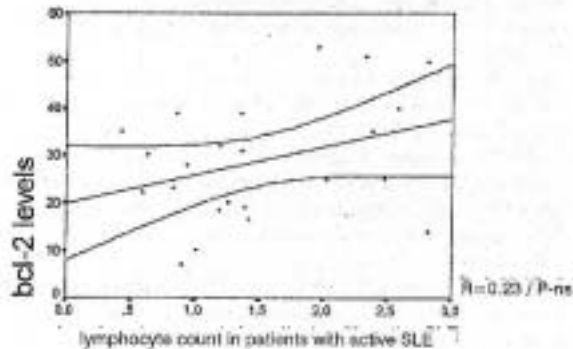


Figure 2. Correlation between bcl-2 levels and lymphocyte counts from active patients.

cellular oncogene in follicular lymphoma (29). At least 85-90% of this type of lymphomas harbour an identical t(14;18) translocation, leading to the expectation that a previously unknown oncogene, designated *bcl-2* (B cell lymphoma/leukemia-2), was activated by the translocation. Likewise, *bcl-2* overexpression is found in many types of malignancy. The *bcl-2* proto-oncogene encodes a 25-Kd protein which is essential for the maintenance of the adult immune system (30,31). This oncogene is involved in T cell development and in thymic selection (32) and has been shown to play a role in T cell apoptosis (33). Alterations in the apoptotic mechanism caused by *bcl-2* overexpression may be important in malignant transformation or growth. An alteration in apoptosis has been suggested as a mechanism in the pathogenesis of SLE. Our study supports this hypothesis: we found an overexpression of *bcl-2* on lymphocytes from patients with active SLE in comparison to normal donors or inactive SLE. Moreover, we found a clear correlation between *bcl-2* levels and SLE activity measured by one of the most widely employed activity criteria of this disease: the SLEDAI score. There is a clear relationship between SLEDAI score and *bcl-2* levels in lymphocytes, with greater concentrations in patients with a higher SLEDAI score. This concentration is not related to the number of lymphocytes in patients with active disease, as shown in Figure 2. Although patients with active disease have a lower number of lymphocytes, they have higher *bcl-2* concentrations than healthy people or patients with non-active disease. However, several authors have reported contradictory results (10-16,28,34-35). We believe that the likely explanation for the discrepancies in these results is that the authors have not used the SLEDAI score to measure disease activity and have not taken the lymphocyte count into account.

In summary, the relationship of *bcl-2* levels in whole blood with SLE activity, the positive correlation of *bcl-2* levels with SLE activity (SLEDAI score), and the lack of correlation with the lymphocyte count suggest that *bcl-2* overexpression is

involved in lymphocyte escape from apoptosis in SLE patients. It is possible that the self-reactive lymphocytes, which are related to autoimmune phenomena, avoid apoptosis by the overexpression of *bcl-2*. Further studies are required to investigate more fully the biological importance and clinical significance of alterations in *bcl-2* in the pathogenesis of SLE, and the longitudinal study of these patients might provide new clues for monitoring SLE disease activity and, possibly, for predicting treatment resistance degree.

## References

- 1 Monaghan P, Robertson D, Amos TAS, Dyer MJS, Mason DY, Grewer MP: Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* 40: 1819-1825, 1992.
- 2 Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W Nahn M, Korsmeyer SJ: bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic death. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6961-6965, 1991.
- 3 Gruninger WB, Seto M, Bostain B, Goldman P, Korsmeyer SJ: Expression of bcl-2 and bcl-2 Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest* 80: 1512-1515, 1987.
- 4 LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML: Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 142: 745-753, 1993.
- 5 Gruninger WB, Smolen JS: Should the clinician have interest in the deregulation of apoptosis in autoimmunity? *Br J Rheumatol* 36: 1244-1246, 1997.
- 6 McDonnell T, Desse N, Platt F, Nunez G, Jaeger U, McKearn J: bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57: 79-88, 1989.
- 7 Strasser A, Wittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S: Enforced bcl-2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8661-8665, 1991.
- 8 Nunez G, Hockenbery D, McDonnell TJ, Sorensen CM, Korsmeyer SJ: bcl-2 maintains B-cell memory. *Nature* 353: 71-73, 1991.
- 9 Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A: Elimination of self-reactive lymphocytes-B proceeds in 2 stages: arrested development and cell death. *Cell* 72: 325-335, 1994.
- 10 Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, Kiener H, Presterl E, Jaeger U, Smolen JS, Gruninger WB: High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 37: 1423-1430, 1991.
- 11 Kumagai S, Yamagata H, Tsujimoto Y: Increased expression of bcl-2 protein in peripheral B cells of patients with systemic LUPUS erythematosus (abstract). *Arthritis Rheum* 36(suppl 9): S76, 1993.
- 12 Gatenby PA, Irvine M: The bcl-2 proto-oncogene is overexpressed in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 7: 623-631, 1994.
- 13 Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA: Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review. *Br J Rheumatol* 36: 158-163, 1997.
- 14 Gruninger WB: Transcriptional overexpression of the protooncogene bcl-2 in patients with systemic lupus erythematosus. *Wien Klin Wochenschr* 104: 205-207, 1992.
- 15 Chan EY, Ko SC, Lau SC: Increased rate of apoptosis and decreased expression of bcl-2 protein in peripheral blood lymphocytes from patients with active systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol* 15: 3-7, 1997.

## ANTICANCER RESEARCH 19: 3073-3076 (1999)

- 16 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 Rheumatol* 34(2): 3160-3200, 1995.
- 17 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF: The 1982 revised criteria for classification of SLE. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1272, 1982.
- 18 Bombardier C, Gladman DG, 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* 35: 630-640, 1992.
- 19 McLaughlin JR, Bombardier C, Farewell VT: Kidney biopsy in systemic lupus erythematosus. III. Survival analysis controlling for clinical and laboratory variables. *Arthritis Rheum* 37: 559-567, 1994.
- 20 Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJA, Myser E, Elkon KB: Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 1735-1737, 1995.
- 21 Jodo S, Koyayashi S, Kayagaki N, Ogura N, Feng Y, Amasaki Y, Fujisaku A, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Koike T: Serum levels of soluble Fas/APO-1.(CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 107: 89-95, 1997.
- 22 Subzevari H, Propp S, Kono DH, Theofilopoulos AN: G1 arrest and high expression of cyclin kinase and apoptosis inhibitors in accumulated activated/memory phenotype CD4<sup>+</sup> cells of older lupus mice. *Eur J Immunol* 27: 1901-1910, 1997.
- 23 Month JD, Zhou T, Su X: Autoimmune disease results from multiple interactive defects in apoptosis induction molecules and signaling pathways. *Behring Inst Mitt* 99: 200-219, 1996.
- 24 Herrmann M, Zoller OM, Hagenhofer M, Voll R, Kalden JR: What triggers anti-dsDNA antibodies? *Mol Biol Rep* 23: 265-267, 1996.
- 25 Koh JS, Levine JS: Apoptosis and autoimmunity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6: 259-266, 1997.
- 26 Kalden JR: Defective phagocytosis of apoptotic cells: possible explanation for the induction of autoantibodies in SLE. *Lupus* 6: 326-327, 1997.
- 27 Emlen W, Niebur J, Kadara R: accelerated *in vitro* apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 152: 3685-3692, 1994.
- 28 Lorenz HM, Grunke M, Hieronymus T, Herrmann M, Kuhnel A, Manger B, Kalden JR: *In vitro* apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 40: 306-317, 1997.
- 29 Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443, 1985.
- 30 Monaghan P, Robertson D, Amos TAS, Dyer MJS, Mason DY, Greaves MF: Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* 40: 1819-1825, 1992.
- 31 Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Shinkai Y, Louie MC, Fields LE, Lucas PJ: Disappearance of the lymphoid system in bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 267: 1584-1588, 1993.
- 32 Gratton-Deans J, Ding LY, Turka LA, Nunez G: bcl-2 protooncogene expression during human T-cell development: evidence for biphasic regulation. *J Immunol* 151: 83-917, 1993.
- 33 Katsumata M, Siegel RM, Louie DC, Miyashita T, Tsujimoto Y, Nowell PC: Differential effects of bcl-2 on T-cells and B-cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1137-1138, 1992.
- 34 Ohsako S, Hara M, Harigai M, Fukusawa C, Kashiwazaki S: Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 73: 109-114, 1994.
- 35 Kumagai S: Apoptosis and SLE. *J Clin Exp Med* 176: 314-319, 1996.

Received March 9, 1999

Accepted May 13, 1999

### **5.1.1. SINTESIS DE LOS RESULTADOS MAS DESTACADOS**

#### **1- Relación de Bcl-2 con la presencia de enfermedad lúpica**

- No hay diferencias en cuanto a los niveles de Bcl-2 entre los pacientes lúpicos y el grupo control.

#### **2- Relación de Bcl-2 con la actividad de la enfermedad**

- Los pacientes con LES activo tienen niveles mayores de Bcl-2 que los pacientes con LES en fase inactiva y el grupo control.
- Los niveles de Bcl-2 se correlacionan con el índice de actividad (SLEDAI).
- Los niveles de Bcl-2 no guardan relación con el número de linfocitos que tiene el paciente, sino con la actividad de la enfermedad, ya que los pacientes lúpicos más activos tienen menor número de linfocitos en sangre periférica; en cambio, los niveles de Bcl-2 son más elevados cuanto mayor es la actividad.

#### **3- Relación de Bcl-2 con el tratamiento**

- No hemos encontrado relación entre los niveles de Bcl-2 y el tipo de tratamiento recibido.
- Los niveles de Bcl-2 no se correlacionan con la dosis de glucocorticoides administrada.



### **5.1.2. CONCLUSIONES PARCIALES**

- 1- Los niveles sanguíneos de la oncoproteína Bcl-2 no están elevados en los pacientes con LES considerados de forma global, por lo que este oncogen no parece tener relación con la patogenia de esta enfermedad.
  
- 2- Los niveles de la oncoproteína Bcl-2 en sangre periférica se relacionan sólo con la actividad de la enfermedad lúpica.
  
- 3- El mecanismo de acción del tratamiento inmunosupresor que se utiliza en el LES no parece relacionado con la vía apoptótica de la Bcl-2.

**5.2. RELACION DE LOS ONCOGENES (*fas* Y *bcl-2*) Y LAS  
CITOCINAS (IL-10 Y TNF-ALFA) CON LA PATOGENIA Y LA  
ACTIVIDAD DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

## Relationship of Oncogenes (sFas, Bcl-2) and Cytokines (IL-10, alfa-TNF) with the Activity of Systemic Lupus Erythematosus

CARLOS MIRET<sup>1</sup>, JOSÈ FONT<sup>1</sup>, RAFAEL MOLINA<sup>2</sup>, MÀRIO GARCIA-CARRASCO<sup>1</sup>, XAVIER FILELLA<sup>2</sup>, MANEL RAMOS<sup>1</sup>, RICARD CERVERA<sup>1</sup>, ANTONIO BALLESTA<sup>2</sup> and MIGUEL INGELMO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Systemic Autoimmune Disease Unit and <sup>2</sup>Laboratory of Clinical Biochemistry (IDIBAPS), Hospital Clínic, Barcelona, Spain

**Abstract.** Background: Different oncogenes (Fas and bcl-2) and diverse cytokines (IL-10 and alfa-TNF) may have an effect on the regulation of apoptosis. The majority of studies to date have evaluated only one or two of these elements independently and it is difficult to obtain a global view of apoptosis dysregulation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) and their role in disease activity. The aim of this study was to evaluate serum levels of sFas, bcl-2, IL-10 and alfa-TNF in human SLE patients and to analyze their relationship with disease activity and with regulation of the apoptotic process. Patients and Methods: Serum levels of sFas and cytokines IL-10 and alfa-TNF were studied by enzyme-linked immunosorbent assay. Bcl-2 antigen expression was analyzed in heated lymphocytes from 51 SLE patients. The disease activity was analyzed according to the SLE disease activity index (SLEDAI). Results: SLE patients had higher levels of sFas ( $p=0.0006$ ) and alfa-TNF ( $p<0.0001$ ) than the control group. No relationship was found between the levels of bcl-2 and IL-10 from SLE patients and the control group. However, there was a significant correlation between SLEDAI and bcl-2 ( $p<0.001$ ) and IL-10 levels ( $p=0.004$ ). In contrast, we found that sFas and alfa-TNF were not related with disease activity. A significant correlation of sFas with alfa-TNF serum levels ( $p=0.003$ ,  $R=+0.41$ ) and bcl-2 antigen expression ( $p=0.02$ ,  $R=+0.32$ ) was observed. Conclusion: sFas and alfa-TNF serum levels are increased in SLE patients. sFas levels seems to be secondary to alfa-TNF action, which is enhanced in inflammatory conditions such as SLE. Bcl-2 antigen expression and IL-10 serum levels are related to the maintenance of SLE activity. These alterations may interfere with the apoptotic process, promoting lymphocyte hyperactivity secondary to increased cytokine levels, and causing the characteristic features of SLE.

Correspondence to: Dr. R. Molina-Porto, Laboratorio de Bioquímica, Unidad de estudio del cancer, Hospital Clínic i provincial (esc 5, piso 4<sup>a</sup>), C/ Villarroyel 170, 08036-Barcelona, Spain. Tel: 93 227.54.00 (ext. 2286, 2006), Fax: 93 227.54.54, e-mail: rmolina@clinic.ub.es

**Key Words:** Apoptosis, Fas, Bcl-2, cytokines, systemic lupus erythematosus.

Lymphocyte survival is carefully regulated in order to maintain the dynamic balance between host defence and aggression towards self. This process is known as apoptosis or programmed cell death and is crucial in the establishment of self-tolerance (1). Several lines of evidence suggest that defective apoptosis of autorreactive lymphocytes may be involved in the pathogenesis and activity of systemic lupus erythematosus (SLE) (2).

Based on murine SLE models, several studies have shown links between auto-immunity and two apoptosis-related molecules (Fas/APO1 and bcl-2). Fas/APO1 (CD95) is a cell surface molecule involved in the induction of apoptosis. In contrast, bcl-2 is an intracytoplasmatic protein that enhances cell survival by inhibiting apoptosis. The overexpression of Fas antigen in SLE lymphocytes has been reported (3-6). In addition to the messenger RNA (mRNA) that encodes membrane Fas, lymphocytes obtained from SLE patients contain an alternatively spliced form of Fas mRNA. This mRNA lacks the transmembrane domain and is secreted as a soluble Fas protein (sFas). Elevated serum levels of sFas in SLE patients have been reported by several independent groups (7-15), suggesting that increased levels of sFas may block apoptosis of activated peripheral lymphocytes and thus impair lymphocyte apoptosis and contribute to the auto-immune phenomena in SLE (7). Furthermore, some studies (4-5,7-9,14) have suggested that sFas levels may contribute to disease activity in SLE patients. However, other authors have obtained contradictory results (11,16-17).

Overexpression of bcl-2 in transgenic mice leads to inhibition of clonal deletion of self-reactive B lymphocytes (18) and favours development of a disease that resembles SLE. Different groups of investigators (5,19-23) have found that a higher intensity of apoptosis-inhibiting protein bcl-2 is expressed on SLE lymphocytes, whereas other groups have described decreased expression of bcl (24) or did not detect differences in bcl-2 expression on lymphocytes from human SLE in comparison with normal donors (25). The relationship of bcl-2 protein with disease activity remains controversial (5,19,21-22,25).

Several studies on the regulatory mechanism for apoptosis induction in human SLE have suggested that the micro-

## ANTICANCER RESEARCH 21: 3053-3060 (2001)

environment in which the clonal expansion of lymphocytes occurs affects their predisposition to activation-induced cell death (23,26). Defective expression of cytokines seems to play an important role in the alteration of lymphocytes in SLE (27-28). Some studies (29-33) have shown that bcl-2 gene product expression can be enhanced by cytokines such as alfa-TNF and IL-10. Several reports have emphasized the importance of alfa-TNF in the induction of activation-induced cell death (AICD) (34-38), but it is not clear whether this phenomena is involved in the enhanced apoptosis observed in SLE (39). IL-10 has been reported at increased levels in active SLE and this cytokine has been related to promoting lymphocyte apoptosis through the Fas pathway (39).

Some authors have studied one or two of the apoptosis-related molecules in SLE, but the studies that evaluate several of these molecules in the same SLE population are scarce and with controversial results (26,33,39). The purpose of this study was to evaluate sFas, bcl-2 antigen and cytokines (IL-10 and alfa-TNF) levels simultaneously and explore their relationship with disease activity in a SLE population.

### Materials and Methods

**Patients.** We studied sFas, IL-10 and alfa-TNF serum levels and bcl-2 antigen expression in lysated whole blood samples from 51 SLE patients who were diagnosed according the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of SLE (40). Activity was measured by the SLEDAI score (41). Control group were 30 sex- and age-matched healthy volunteers. The clinical features of SLE patients were as follows: 46 were female and 5 were male; the mean age was 38+/-13 years (range 17-68); mean disease activity assessed with SLEDAI was 6.82+/-5.2 (rank 0-24).

**Preparation of samples.** Heparinized venous peripheral blood was obtained by venous puncture in the early morning.

**Bcl-2 determination by enzyme-linked immunosorbent assay in whole blood samples.** Two hundred and fifty microlitres of whole blood sample were mixed with 50 microlitres of lysis reagent and the supernatant frozen at -70°C. Bcl-2 oncoprotein was determined in the supernatant, using a commercially available technique, Endogen Human Bcl-2 Elisa (Endogen Inc, Woburn, USA). Serum samples were obtained by venous puncture, centrifuged and stored at -20°C within 4 hours of extraction. sFas, IL-10 and alfa-TNF were determined using sandwich-immunoassay commercially available methods from Otsuige Science, Immunotech and Medgenic (Fleurus, Belgium), respectively.

**Statistics.** Statistical significance was assessed by the Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test for quality variables and by the Mc Pearson and Spearman coefficient of correlation for quantity values. Differences were considered significant if  $p \leq 0.05$ .

### Results

**SLE population.** Serum levels of sFas, bcl-2, IL-10 and alfa-TNF were analyzed in 51 consecutive SLE patients from our Unit and compared with control group as shown in Table I. sFas and alfa-TNF concentrations were significantly

Table I. Levels of sFas, bcl-2, IL-10 and alfa-TNF in SLE patients and control group.

		n	Mean +/-SD	Rank	p
sFas	Controls	30	1.45+/-1.12	0.37-5.1	0.0006
	SLE patients	51	2.65+/-1.72	0.1-7.7	
Bcl-2	Controls	30	21+/-7.1	11.6-41.7	ns
	SLE patients	51	22.6+/-11.6	7-53	
IL-10	Controls	30	1.63+/-1.35	1-7	ns
	SLE patients	51	1.88+/-2.34	1-15	
Alfa-TNF	Controls	30	21.3+/-9.7	4-48	<0.0001
	SLE patients	51	45.7+/-19.5	15-90	

p: significance (differences were considered significant if  $p \leq 0.05$ ); ns: non significant.

higher in SLE patients than in the control group ( $p=0.0006$  and  $p<0.0001$ , respectively). By contrast, there were no differences with bcl-2 and IL-10 levels.

**SLE activity.** According to SLEDAI score, only bcl-2 and IL-10 levels were positively correlated with activity of SLE ( $p<0.001/r=+0.48$  and  $p=0.004/r=+0.39$ , respectively) (Figure 1). In order to rule out the possible influence of different factors on the results we analyzed.

**Renal function.** sFas and alfa-TNF were correlated with creatinine values ( $p=0.001$ ,  $R=+0.44$ ;  $p=0.004$ ,  $R=+0.40$ , respectively) (Figure 2), but not bcl-2 or IL-10. We evaluated the sFas and alfa-TNF levels of a group of SLE patients with normal renal function ( $n=47$ ) (creatinine values < 1.3 mg/dl). The differences in sFas and alfa-TNF levels between normal renal function SLE patients and controls were maintained ( $p=0.002$  and  $p<0.0001$ , respectively) (Table II). No correlation between sFas, bcl-2, IL-10 and alfa-TNF levels and proteinuria was found.

**Clinical subsets.** Elevated levels of bcl-2 were related with the presence of nephropathy ( $p=0.04$ ); IL-10 was related with the presence of cutaneous vasculitis ( $p=0.0012$ ) (Table III). No relation was found between sFas or alfa-TNF levels and clinical subsets.

**Laboratory parameters.** Alfa-TNF levels were correlated with erythrocyte sedimentation rate (ESR) ( $p<0.001$ ,  $R=+0.58$ ), while IL-10 levels were positively-correlated with anti-DNA antibodies levels and negatively with CH50 ( $p=0.013$ ,  $R=+0.34$  and  $p=0.044$ ,  $R=-0.28$ , respectively); bcl-2 levels

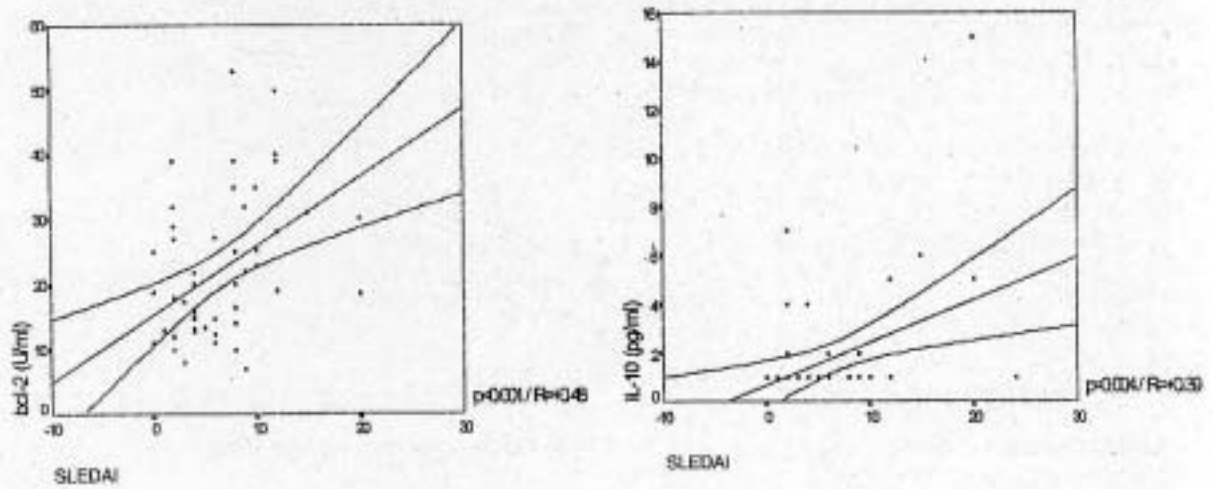


Figure 1. Correlation of *bcl-2* and *IL-10* levels with *SLEDAI* score.

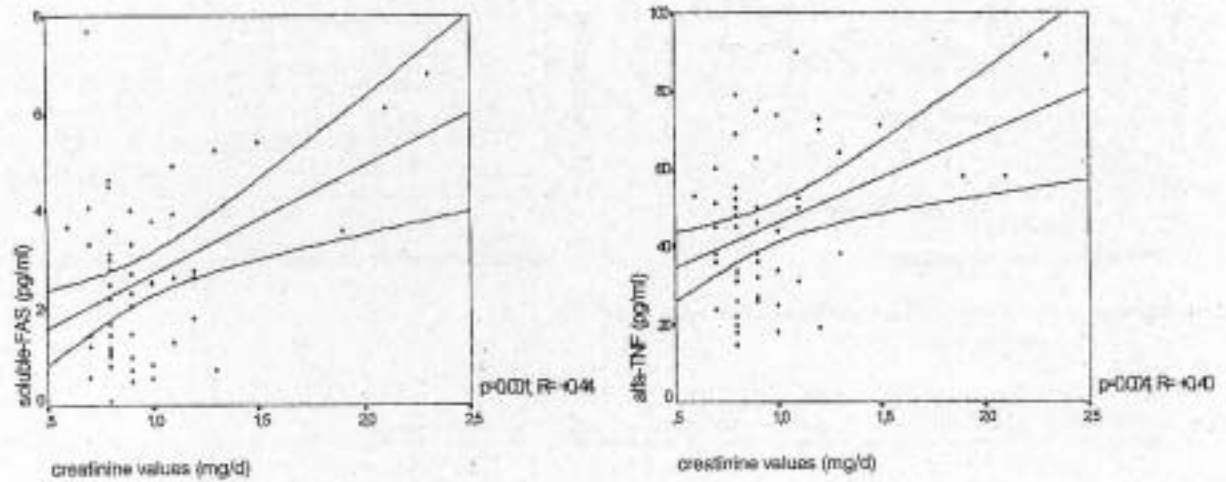


Figure 2. Correlation of *sFas* and *alpha-TNF* levels with *creatinine* values.

correlated positively with the lymphocyte count ( $p=0.03$ ,  $R=+0.31$ ) (Figure 3). No relation was found between *sFas* levels and these biological parameters. Finally, *sFas* levels correlated and positively with *bcl-2* and *alpha-TNF* levels ( $p=0.023$ ,  $R=+0.32$ ;  $p=0.003$ ,  $R=+0.41$ ; respectively) (Figure 4) but no correlations were found between *alpha-TNF* levels and *IL-10* or *bcl-2* levels, nor between *IL-10* and *sFas* values.

## Discussion

Abnormalities of expression of cytokine genes have been considered as an important factor in the development of SLE. It has been suggested that, contrary to murine models, the overexpression of the apoptosis-related oncogenes in lymphocytes from SLE patients is a secondary phenomenon and occurs as a result of increased cytokine levels rather than

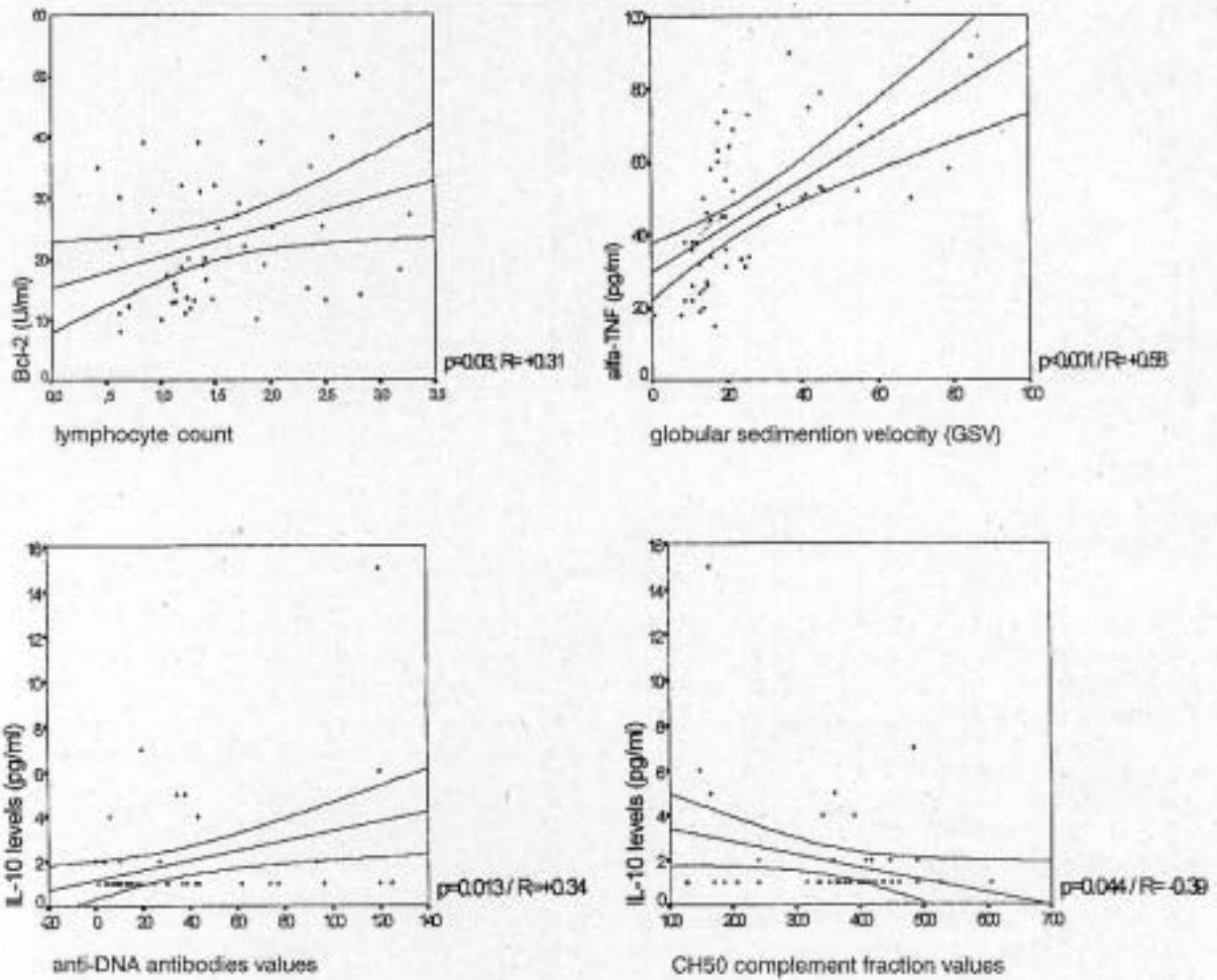


Figure 3. Correlation of bcl-2, alpha-TNF and IL-10 levels with laboratory parameters.

Table II. Differences of sFas and alpha-TNF levels between normal renal function SLE patients and controls.

		n	Mean +/- SD	Rank	p
sFas	Normal renal function SLE patients	47	2.41 +/- 1.53	0.1 - 7.7	0.002
	Controls	30	1.45 +/- 1.12	0.37 - 5.1	
alpha-TNF	Normal renal function SLE patients	47	43.7 +/- 18.7	15 - 90	<0.0001
	Controls	30	21.3 +/- 9.7	4 - 48	

p: significance (differences were considered significant if  $p \leq 0.05$ )

as a consequence of genetic factors (27-28,42).

We found that SLE patients had elevated sFas and alpha-TNF levels, but without correlation to SLE activity. It is tempting to speculate that these molecules have a role in the pathogenesis of SLE independent of disease activity, in

concordance with findings obtain by other authors (10-13,34-38). The discrepancies with other authors (7-9,14,39) may be due to: 1) Genetic differences in the studied population (e.g. Japanese); 2) Different score used to measure disease activity. Some authors use the BILAG activity index which takes into



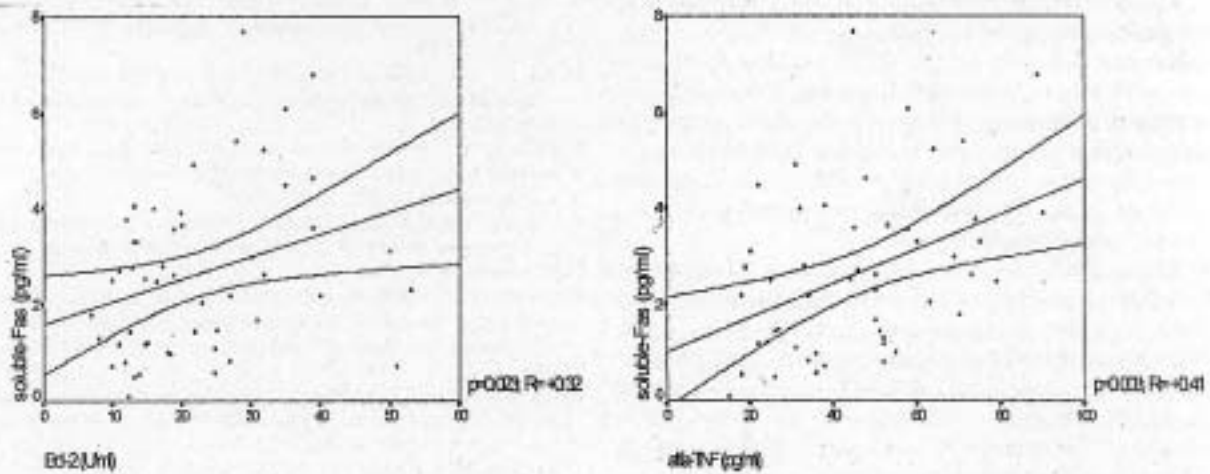


Figure 4. Correlation of sFas levels with bcl-2 and alpha-TNF levels.

account the intention to treat. We selected SLEDAI which is a descriptive score that uses different clinical and biological variables to determine the disease activity; and 3) The relation of sFas and alpha-TNF levels with renal function. Several molecules are eliminated by the urine and increase their levels when renal function is impaired. We found that sFas and alpha-TNF levels were correlated with creatinine values. Nevertheless, the differences in sFas and alpha-TNF levels between SLE patients and controls were maintained when we studied only the SLE patients that had normal renal function. Therefore, renal function influences the levels of these molecules but it is not responsible for the elevated levels of sFas and alpha-TNF in SLE patients.

The importance of alpha-TNF in the induction of activation-induced cell death (AICD) has been demonstrated by several authors (34-38), but it is not clear whether this phenomenon is involved in the enhanced apoptosis observed in SLE (39). We observed that alpha-TNF levels were elevated in SLE patients and correlated positively with sFas levels. There was a close correlation between alpha-TNF levels and ERS values (a non-specific parameter of inflammation). Nevertheless, sFas and alpha-TNF levels did not correlate with other activity markers of this disease. Therefore, it seems that the elevated levels of alpha-TNF that we found in SLE patients could be secondary to the presence of the characteristic inflammation of the auto-immune state and that elevated levels of sFas could be inherent to the disease itself. In SLE overproduction of alpha-TNF stimulates the secretion of sFas, and leads occurs which to the inhibition of the apoptosis of auto-reactive lymphocytes.

With respect to bcl-2, we and other authors (5,22) found that this molecule is related with disease activity (correlation with SLEDAI score and presence of nephropathy) and with

Table III. Differences of bcl-2 and IL-10 levels between SLE patients with presence and absence of clinical subsets.

	n	Mean +/- SD	Rank	p
Bcl-2	Presence of nephropathy	24 25.4 +/- 13.0	7 - 53	0.04
	Absence of nephropathy	27 30.2 +/- 9.7	8 - 50	
IL-10	Presence of cutaneous vasculitis	3 7.33 +/- 6.81	2 - 15	0.0012
	Absence of cutaneous vasculitis	48 1.54 +/- 1.35	1 - 7	

p: significance (differences were considered significant if p ≤ 0.05)

lymphocyte counts, thus corroborating the idea that bcl-2 over-expression produces an enhancement of cell survival and maintains an active state of the disease by stimulating the survival of auto-reactive lymphocytes. However, other authors have not confirmed these findings (19,21,25). This may be due to significant differences in the laboratory technique used to measure bcl-2 levels. Bcl-2 is an intracytoplasmatic protein and some authors do not lyse the lymphocytes prior to measuring this protein. Bcl-2 gene product expression can be enhanced by cytokines such as IL-10 (29-33). Increased secretion of IL-10 has been reported in active SLE (39). We observed that IL-10 is related with disease activity. There was correlation of IL-10 levels with SLEDAI values, with anti-DNA antibodies and the CH50 fraction of the complement and with the presence of cutaneous vasculitis, all activity parameters. It is possible that IL-10 inhibits apoptosis by stimulating bcl-2 expression, but we found no correlation between IL-10 and bcl-2 in our SLE patients. This suggests that IL-10 produces

lymphocyte activation by another pathway. Georgescu *et al* (39) found an increase in spontaneous cell death in SLE patients and they showed how IL-10, which is present at increased levels in active SLE, promotes T-cell apoptosis through the Fas pathway. However, more studies need to be performed in order to clarify this point. Bcl-2 is correlated with sFas levels. It is possible that some regulatory mechanism exists between them, but further studies are needed to determine this relationship.

The objective of the study was to show a overall global vision of the functioning of some molecules that are involved in the regulatory mechanism of apoptosis. sFas, which interferes with AICD Fas pathway blocking rFas/LFas (Fas ligand) union, is overexpressed in SLE serum patients. sFas seems to be stimulated by the action of alfa-TNF, which is increased in inflammatory conditions. These disorders promote lymphocyte differentiation and hyperactivity (43-46) leading to the persistence of autoreactive lymphocytes. Bcl-2 and IL-10, which are related to disease activity, seem to have a role in maintaining this lymphocyte hyperactivity.

In conclusion, SLE lymphocytes are influenced by different elements that are closely interrelated. Regulation of apoptosis in SLE lymphocytes is probably achieved by a balance between inhibitors (sFas stimulated by alfa-TNF which blocks rFas action, and bcl-2) and inducers (rFas possibly stimulated by IL-10) of apoptosis, producing the characteristic features of SLE and maintaining the autoimmunity state.

#### Acknowledgements

This work was supported by Spanish grant FISS 99/0280. C. Miret was a research fellow sponsored by a grant from the Hospital Clinic of Barcelona, Spain.

#### References

- 1 Granger WB and Smolen JS: Should the clinician have interest in the deregulation of apoptosis in autoimmunity? *Br J Rheumatol* 36: 1244-1246, 1997.
- 2 Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA: Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review. *Br J Rheumatol* 36: 158-163, 1997.
- 3 Mysler E, Bini P, Drappa J *et al*: The apoptosis/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 93: 1029-1034, 1994.
- 4 Papo T, Parizot C, Ortova M *et al*: Apoptosis and expression of soluble Fas mRNA in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7: 455-461, 1998.
- 5 Ohsako S, Hara M, Harigai M *et al*: Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 73: 109-114, 1994.
- 6 Miyawaki T, Ueura T, Nibu R *et al*: Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulation in human peripheral blood. *J Immunol* 149: 3753-3758, 1992.
- 7 Cheng J, Zhou T, Liu C *et al*: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263: 1759-1762, 1994.
- 8 Jodo S, Kovayashi S, Kayagaki N *et al*: Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 107: 89-95, 1997.
- 9 Tuzano Y, Miyake S, Kayagaki N *et al*: Soluble Fas molecule in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 16: 261-265, 1996.
- 10 Nozawa K, Kayagaki N, Tuzano Y *et al*: Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 40: 1126-1129, 1997.
- 11 Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA: Elevated soluble Fas production in SLE correlates with HLA status not with disease activity. *Lupus* 7: 717-722, 1997.
- 12 Lopik TV, Bijl M, Hart M *et al*: Patients with systemic lupus erythematosus with high plasma levels of sFas risk relapse. *J Rheumatol* 26: 60-67, 1999.
- 13 Courtney PA, Crocicard AD, Williamson K *et al*: Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. *Lupus* 8: 508-513, 1999.
- 14 Bijl M, Van Lopik T, Limburg PC *et al*: Do elevated levels of serum-soluble Fas contribute to the persistence of activated lymphocytes in systemic lupus erythematosus? *J Autoimmun* 11: 457-463, 1998.
- 15 Al-Maini MH, Moutz JD, Al-Mohri HA *et al*: Serum levels of soluble Fas correlate with indices of organ damage in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 9: 132-139, 2000.
- 16 Knipping E, Krammer PH, Onel KB *et al*: Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 1735-1737, 1995.
- 17 Goel N, Ulrich DT, St. Clair EW *et al*: Lack of correlation between serum soluble Fas/apo-1 levels and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 38: 1738-1743, 1995.
- 18 Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA *et al*: Elimination of self-reactive lymphocytes-B proceeds in 2 stages: arrested development and cell death. *Cell* 72: 325-335, 1993.
- 19 Aringer M, Witenberger W, Steiner CW *et al*: High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, ut not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 37: 1423-1430, 1994.
- 20 Kumagai S, Yanagida H and Tsujimoto Y: Increased expression of bcl-2 protein in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus (abstract). *Arthritis Rheum* 36(suppl 9): S76, 1993.
- 21 Gatenby PA, Irvine M: The bcl-2 proto-oncogene is overexpressed in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 7: 623-631, 1994.
- 22 Granger WB: Transcriptional overexpression of the protooncogene bcl-2 in patients with systemic lupus erythematosus. *Wien Klin Wochenschr* 104: 205-207, 1992.
- 23 Lorenz HM, Gränke M, Hieronymus T *et al*: "In vivo" apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 40: 306-317, 1997.
- 24 Chan EY, Ko SC and Lau SC: Increased rate of apoptosis and decreased expression of bcl-2 protein in peripheral blood lymphocytes from patients with active systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol* 15: 3-7, 1997.
- 25 Rose LM, Latchman DS and Isenberg DA: Bcl-2 expression is unaltered in unfractionated peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 340: 3160-3200, 1995.
- 26 Yang BC, Wang YS, Lin LC *et al*: Induction of apoptosis and cytokine gene expression in T-cell lines by sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 45: 96-102, 1997.
- 27 Hünig T and Schimpl A: Systemic autoimmune disease as a consequence of defective lymphocyte death. *Curr Opin Immunol* 9: 826-830, 1997.
- 28 Alvarado-de la Barrera C, Akocor-Varela J, Richaud-Patin Y *et al*: Differential oncogene and TNF-alpha mRNA expression in bone marrow cells from systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Immunol* 48: 551-556, 1998.
- 29 Firestein GS, Yeo M and Zvaifler NJ: Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* 96: 1631-1638, 1995.



- 30 Jewell AP, Weeman CP, Lydyard PM *et al*: Interferon- $\alpha$  up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL from apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Haematol* 88: 268-274, 1994.
- 31 Arnant M, Delespesse G and Sarfati M: IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression. *Immunology* 85: 331-337, 1995.
- 32 Rimando MS, Su K, Falk LA *et al*: Human interleukin-3 receptor modulates bcl-2 mRNA and protein levels through protein kinase C in TF-1 cells. *Blood* 86: 80-88, 1995.
- 33 Mehrian R, Quismorio FP, Strassmann G, Gauderman WJ, Morrison J, Brautbar C, Jacob CO *et al*: Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41: 596-602, 1998.
- 34 Dhein J, Walzok H, Baumler C *et al*: Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1 (Fas/CD95). *Nature* 373: 438-441, 1995.
- 35 Zheng L, Fisher G, Miller RE *et al*: Induction of apoptosis in mature T-cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377: 348-351, 1995.
- 36 Zajac AJ, Quinn DG, Cohen PL *et al*: Fas-dependent CD4+ cytotoxic T-cell-mediated pathogenesis during virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14720-14725, 1996.
- 37 Kovacs B, Vassilopoulos D, Vogelgesang SA *et al*: Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular  $\alpha$ 1-TNF. *Clin Immunol Immunopathol* 81: 293-302, 1996.
- 38 Park YB, Kim DS, Lee WK *et al*: Elevated serum interleukin-15 levels in systemic lupus erythematosus. *Yonsei Med J* 40: 343-348, 1999.
- 39 Georgescu I, Valkulanku RK, Elkon KB *et al*: Interleukin-10 promotes activation-induced cell death of SLE lymphocytes mediated by Fas ligand. *J Clin Invest* 100: 2622-2633, 1997.
- 40 Tan EM, Cohen AS, Fries JF *et al*: The 1982 revised criteria for classification of SLE. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1272, 1982.
- 41 Bombardier C, Gladman DG, Urowitz MB *et al*: Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 35: 630-640, 1992.
- 42 Huang QR, Morris D and Manolios N: Evaluation of the bcl-2 gene locus as a susceptibility locus linked to the clinical expression of systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 16: 121-124, 1996.
- 43 Llorente L, Zou W, Levy Y *et al*: Role of interleukin-10 in the B-lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 181: 839-844, 1995.
- 44 Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S *et al*: Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med* 179: 306-310, 1994.
- 45 Itoh K and Hirohata S: The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation and differentiation. *J Immunol* 154: 4341-4350, 1995.
- 46 Malisan F, Briere F, Bridon JM *et al*: Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD-40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* 183: 937-947, 1996.

Received January 22, 2001

Accepted May 17, 2001

### **5.2.1. SINTESIS DE LOS RESULTADOS MAS DESTACADOS**

#### **1- Relación de sFas, TNF-alfa y IL-10 con la presencia de enfermedad lúpica**

- Los pacientes lúpicos tienen niveles más elevados de sFas y TNF-alfa que los sujetos del grupo control.

#### **2- Relación de sFas, TNF-alfa y IL-10 con la actividad de la enfermedad**

- Los niveles de IL-10 se correlacionan positivamente con el índice de actividad (SLEDAI) y los niveles de anticuerpos anti-DNA, y negativamente con los niveles de CH50 del complemento.
- Los niveles de IL-10 elevados en los pacientes lúpicos activos no están influenciados por la alteración de la función renal o presencia de proteinuria.
- No hay correlación de los niveles de sFas y TNF-alfa con la actividad de la enfermedad.

#### **3- Relación entre los distintos parámetros (sFas, TNF-alfa, Bcl-2 y IL-10)**

- Existe correlación entre los niveles de sFas y Bcl-2, y entre los niveles de sFas y TNF-alfa.
- No hay correlación entre los niveles de sFas y IL-10, entre Bcl-2 y alfa-TNF, entre Bcl-2 y IL-10, ni entre los niveles de TNF-alfa y IL-10, respectivamente.

### **5.2.2. CONCLUSIONES PARCIALES**

- 1- El Fas soluble y el TNF-alfa presentan niveles séricos elevados en los pacientes con LES, por lo que podrían estar implicados en la patogenia de esta enfermedad.
  
- 2- Bcl-2 y TNF-alfa podrían influir en la apoptosis a través de interferir en la vía apoptótica de Fas, al inducir su liberación en sangre periférica en forma soluble (sFas).
  
- 3- El hecho conocido de que los valores elevados de SLEDAI y anticuerpos anti-DNA, y los valores bajos de CH50, son parámetros de actividad del LES, sugiere que los niveles de IL-10 son un buen parámetro de actividad en el LES. Ello no ocurre con el sFas y el TNF-alfa.

**5.3. IMPORTANCIA DEL ONCOGEN P53 Y SU RELACION CON OTROS ONCOGENES (*fas* Y *bcl-2*) Y CITOCINAS (IL-10 Y TNF-ALFA), EN LA PATOGENIA Y LA ACTIVIDAD DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO**

## **RELATIONSHIP OF p53 WITH OTHER ONCOGENES, CYTOKINES AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS ACTIVITY.**

*Carlos Miret, , Rafael Molina<sup>1</sup>, Xavier Filella<sup>1</sup>, Mario García-Carrasco, Gisela Claver, Miguel Ingelmo, Antonio Ballesta<sup>1</sup> and José Font.*

Systemic Autoimmune Disease Service and <sup>1</sup>Laboratory of Clinical Biochemistry (IDIBAPS). Hospital Clínic. Barcelona. Spain.

Supported by spanish grant FISS 99/0280. C. Miret was a research fellow sponsored by a grant from Hospital Clínic of Barcelona.

### **SUMMARY:**

**INTRODUCTION:** Defects in the regulation of apoptosis of the autorreactive lymphocytes are involved in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). The apoptotic process relies on adequate functioning of numerous molecules, including oncogenes and diverse cytokines. p53 has been implicated in the control of the cell cycle through the stimulation of apoptosis of these autorreactive cells.

**OBJECTIVE:** To study the role of the p53 pathway on the regulation of apoptosis in SLE patients and analyze the relationship of the p53 oncoprotein with disease activity and other oncogenes (bcl-2, Fas) and cytokines (IL-10, alfa-TNF), implicated in the apoptotic process and pathogenesis of SLE.

**MATERIALS AND METHODS:** p53 and Bcl-2 antigen expression were determined in lysated lymphocytes from 74 patients with SLE and 30 healthy people. Serum levels of sFas and cytokines IL-10 and alfa-TNF were studied by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** SLE patients had higher levels of p53 protein (0.16+/-0.33) than controls (0.014+/-0.02) ( $p=0.006$ ). Patients with active SLE had higher levels of p53 (0.31+/-0.48) than those with inactive disease (0.08+/-0.17) ( $p = 0.003$ ) who in turn had higher levels than controls (0.01+/-0.02) ( $p = 0.035$ ). A significant correlation was found between levels of p53 and SLE disease activity index

(SLEDAI) ( $R=+0.24$  /  $p=0.04$ ), anti-DNA antibodies ( $R=+0.23$  /  $p= 0.048$ ) and IL-10 levels ( $1.75\pm 2.2$ ) ( $R=+0.4$  /  $p= 0.004$ ). No correlation was found between p53 levels and bcl-2 ( $21.9\pm 10.6$ ), soluble-Fas ( $2.47\pm 1.66$ ) or alfa-TNF levels ( $43.3\pm 23$ ).

**CONCLUSIONS:** The p53 oncoprotein may play a role in the pathogenesis and activity of SLE. IL-10 may influence SLE activity by inhibiting the p53 and Bcl-2/Fas apoptosis pathway of autorreactive cells.

### **INTRODUCTION:**

Several studies have shown that any alteration in the balance between clonal deletion and the induction of anergy in autorreactive cells due to impairment of the apoptotic process may lead to the persistence of autorreactive lymphocytes and play a role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) (1). Different oncogenes and cytokines are implicated in the regulation of apoptosis of these autorreactive cells. Fas/APO1 is a cell surface molecule involved in the induction of apoptosis of autorreactive lymphocytes in SLE patients. Elevated serum levels of soluble Fas protein (sFas) in SLE patients have been reported (2), suggesting that increased levels of sFas (extracellular fraction of Fas protein-receptor) may block apoptosis of activated peripheral lymphocytes and produce an alteration of lymphocyte apoptosis, thus contributing to autoimmune phenomena in SLE (3). Various reports have suggested that Tumor Necrosis Factor alfa (alfa-TNF) may be pathogenic in SLE (4). Aringer et al (5) suggest that TNF may interfere with apoptosis in SLE patients by inhibiting the Fas function. In a previous report, we found that sFas and alfa-TNF serum levels are increased in SLE patients and that sFas expression seems to be secondary to alfa-TNF activity, which is enhanced in SLE (6). A clear correlation was observed between SLE activity and the proportion of autorreactive lymphocytes expressing bcl-2, suggesting that high levels of bcl-2 in these cells may ensure their survival (7). Bcl-2 appears to enhance lymphoid cell survival, at least in part, by interfering with the Fas pathway of apoptosis (8). Different reports have shown that interleukin-10 (IL-10) contributes to the inhibition of apoptosis of

autorreactive cells through increased bcl-2 expression (9-12). Furthermore, IL-10 and bcl-2 expression have been related to disease activity (13-16). We found that bcl-2 antigen expression and IL-10 serum levels are related to the maintenance of activity in SLE, and a positive correlation between bcl-2 and sFas, and between sFas and alfa-TNF levels, respectively(17).

Tumor suppressor molecule p53 has been implicated in the control of the cell cycle through stimulation of apoptosis of autorreactive cells in SLE patients, whose damaged DNA cannot be repaired (18,19). Most studies to date evaluate only one or two of these molecules making it, and difficult to obtain a global view of apoptosis dysregulation in SLE patients. The aim of this report is to study the role of the p53 pathway in the regulation of apoptosis in SLE patients and its relationship with disease activity and with other oncogenes and cytokines that have been related with SLE pathogenesis.

#### **MATERIALS AND METHODS:**

*Human subjects.* We prospectively studied p53 antigen expression in listed whole blood samples from 74 consecutive SLE patients diagnosed according to the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of SLE (20). 66 patients were female and 8 were male; the mean age was 36+/-12 years (range 17-68). The control group were 30 sex- and age-matched healthy volunteers. Activity was measured by the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score (21). Mean disease activity assessed by SLEDAI was 5.76+/-5 (range 1-24). Using the SLEDAI score, 74 patients were divided into two groups in relation to disease activity according to Mc Laughlin et al (22) , to Knipping et al (23) and to Jodo et al (24). 49 patients were matched to an inactive stage (SLEDAI < 8) and 25 to an active stage (SLEDAI > 7) of SLE. Patients treated with glucocorticoids were divided into two groups according to Migita et al (25), a high-dose glucocorticoid treatment group for patients receiving more than 15 mg of prednisolone daily and a low-dose group for patients receiving less than 15 mg.

*Preparation of samples:* Heparinized venous peripheral blood was obtained by venous puncture in the early morning. Bcl-2 and p53 were determined by enzyme-linked immunoabsorbent assay in whole blood samples. 250 microlitres of whole blood sample were mixed with 50 microlitres of lysis reagent and the supernatant frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ . BCL-2 and p53 oncoproteins were determined in the supernatant, using a commercially available techniques, Endogen Human Bcl-2 Elisa (Endogen Inc, Woburn, USA) and Pantropic p53 rapid format ELISA (Oncogene Science, USA), respectively.

Serum samples were centrifuged and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  within 4 hr of extraction. IL-10, alfa-TNF and sFas were determined using commercially sandwich immunosassay available methods from Immnotech, Medgenic, and Oncogene Science, respectively.

*Statistics:* Statistical significance was assessed by the Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis test for quality variables and by the McPearson and Spearman coefficient of correlation for quantity values. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTS:**

*SLE patients.* p53 concentrations were significantly higher in SLE patients ( $0.16\pm 0.33$ ) than in the control group ( $0.014\pm 0.02$ ) ( $p=0.006$ ) (Figure 1). Inactive SLE patients had higher levels of p53 ( $0.08\pm 0.17$ ) than controls ( $p=0.035$ ) (Figure 2).

*SLE activity.* According to the SLEDAI score, active SLE patients had higher levels of p53 ( $0.31\pm 0.48$ ) than inactive ones ( $p = 0.003$ ) (Figure 2). There was a significant correlation between p53 and anti-DNA antibodies levels ( $p=0.048$ ,  $R=+0.23$ ). p53 levels correlated positively with IL-10 ( $p=0.004$ ,  $R=+0.4$ ).

To rule out the possible influence of different factors on the results we analyzed the relationship between p53 levels and renal function and number of cells in samples of SLE patients. No correlation between p53 levels and creatinine, proteinuria or leukocyte and lymphocyte count values was found. Thus, we



considered that the elevated levels of p53 in SLE patients were not influenced by renal function or renal protein loss or leukocyte count.

*Relationship of p53 levels with other cytokynes (alfa-TNF) and oncogenes (Fas, Bcl-2).* No correlation was found between p53 levels and sFas (2.47+/-1.66), bcl-2 (21.9+/-10.6) or alfa-TNF levels (43.3+/-23).

*Treatment.* In order to evaluate the possible influence of treatment on p53, we compared p53 from SLE patients receiving a high (0.08+/-0.24) or low-dose (0.16+/-0.32) of glucocorticoids. No significant differences were observed between the two groups, although there was a tendency to lower p53 levels in the high-dose group.

## **DISCUSSION:**

We found that SLE patients had elevated levels of p53 protein in peripheral blood. These results have not been previously reported, and support the hypothesis that a conformational change of the p53 oncogen produced by mutation may occur upon cell activation, resulting in the formation of a neoantigen (26,27). This neoantigen (p53) has a prolonged half life as elevated levels can be detected in peripheral blood and could explain the presence of anti-p53 antibodies.

Autoimmunity to DNA is controversial, since native DNA is only poorly immunogenic. Thus, the immunogen that actually drives the autoimmune reaction to DNA is probably not DNA itself. Recent reports have shown the existence of anti-p53 antibodies in SLE patients (28). The p53 molecule features a DNA-binding domain that allows it to recognize damaged DNA. In the course of an immune response to p53, antibodies to p53 could be formed that might bind the DNA-binding domain of p53. These antibodies immunologically mimic the structure of damaged DNA. Thus, a DNA-mimicking anti-p53 antibody might induce anti-DNA antibodies. These anti-DNA and anti-p53 antibodies could functionally block p53 activation and reduce the apoptosis of autorreactive lymphocytes in SLE patients (29). We found that p53 levels are correlated with the amount of anti-DNA antibodies, thus indirectly supporting this hypothesis.

Further studies to determine of anti-p53 antibodies in this group of patients are necessary to clarify this point.

p53 levels were correlated with IL-10 levels and with SLE activity. It is known that IL-10 also correlates with disease activity (15-17). These results support the hypothesis that IL-10 and p53 overexpression lead to inhibition of autorreactive lymphocyte apoptosis. An explanation may be that IL-10 induces p53 overexpression, which could stimulate production of anti-p53 and anti-DNA antibodies, with the consequent inhibition of the p53 pathway.

From the results of this study it appears clear that alterations in the p53 apoptosis pathway play an important role in the pathogenesis and activity of SLE. Several cytokines and other oncogenes may interfere with the p53 oncogene product, favouring the survival of autorreactive lymphocytes and facilitating the characteristic features of SLE.

#### **REFERENCES:**

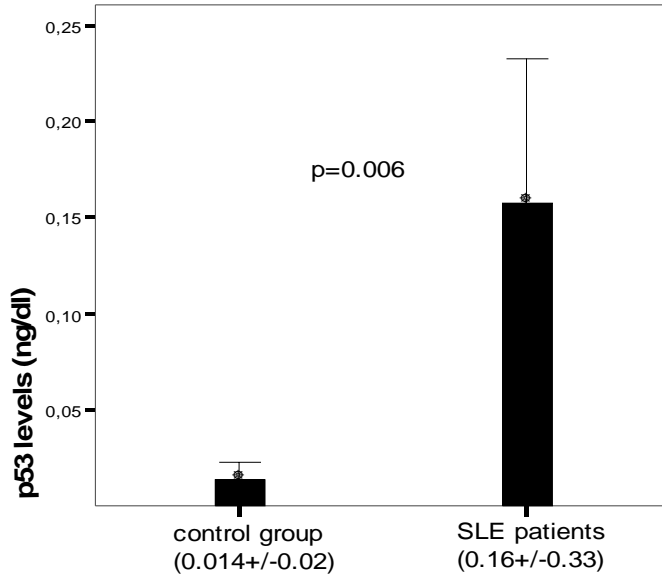
- (1) Gmelig-Meyling F, Dawisha S, Steinberg AD: Assessment of in vivo frequency of mutated T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1992;175:297-300.
- (2) Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, McConnell J, Kennedy RJ, Bell AL: Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. *Lupus* 1999;8:508-513.
- (3) 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.
- (4) Wang M, Dong Y, Huang S: Study of the association between tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1999;38:393-396.
- (5) Aringer M, Feierl E, Steiner G, Stummvoll GH, Hofler E, Steiner CW, Radda I, Smole JS, Graninger WB: Increased bioactive TNF in human systemic lupus erythematosus: associations with cell death. *Lupus* 2002;11:102-108.

- (6) Miret C, Font J, Molina R, Garcia-Carrasco M, Filella X, Ramos M, Cervera R, Ballesta A, Ingelmo M: Relationship of oncogenes (sFas, Bcl-2) and cytokines (IL-10, alfa-TNF) with the activity of systemic lupus erythematosus. *Anticancer Res* 2001;21:3053-3059.
- (7) Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA: Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review. *Br J Rheumatol* 1997;36:158-163.
- (8) Korsmeter SJ: Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol Today* 1992;13:285-288.
- (9) Mehrian R, Quismorio FP Jr, Strassmann G, Stimmler MM, Horwitz DA, Kitridou RC, Gauderman WJ, Morrison J, Brautbar C, Jacob CO: Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41:596-602.
- (10) Cohen SB, Crawley JB, Kahan MC, Feldmann M, Foxwell BM: Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. *Immunology* 1997;92:1-5.
- (11) Weber-Nordt RM, Henschler R, Schott E, Wehinger J, Behringer D, Mertelsmann R, Finke J: Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;88:2549-2558.
- (12) Levy Y, Brouet JC: Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of bcl-2 protein. *J Clin Invest* 1994;93:424-428.
- (13) Hase K, Tani K, Shimizu T, Ohmoto Y, Matsushima K, Sone S: Increased CCR4 expression in active systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol* 2001;70:749-755.
- (14) Liu Y, Yin P, Zhao X: Clinical significance and expression of Bcl-2 protein in patients with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1999;38:94-97.
- (15) Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renauld JC: Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 1995;4:393-395.

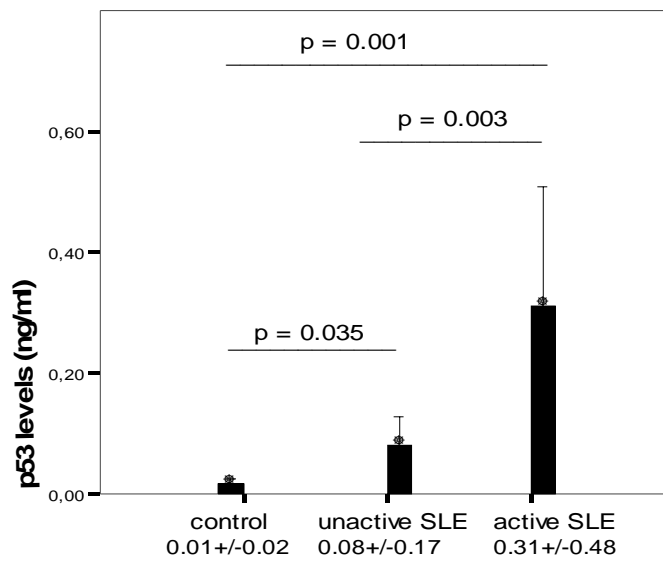
- (16) Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH: Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:283-288.
- (17) Miret C, Font J, Molina R, Garcia-Carrasco M, Filella X, Ramos M, Cervera R, Ballesta A, Ingelmo M: Bcl-2 oncogene (B cell lymphoma/leukemia-2) levels correlate with systemic lupus erythematosus disease activity. *Anticancer Res* 1999;19:3073-3076.
- (18) Alvarado-de la Barrera C, Alcocer-Varela J, Richaud-Patin Y, Alarcon-Segovia D, Llorente L: Differential oncogene and TNF-alpha mRNA expression in bone marrow cells from systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Immunol* 1998;48:551-556.
- (19) Herkel J, Erez-Alon N, Mimran A, Wolkowicz R, Harmelin A, Ruiz P, Rotter V, Cohen IR: Systemic lupus erythematosus in mice, spontaneous and induced, is associated with autoimmunity to the C-terminal domain of p53 that recognizes damaged DNA. *Eur J Immunol* 2000;30:977-984.
- (20) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for classification of SLE. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1272.
- (21) Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH: Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-640.
- (22) McLaughlin JR, Bombardier C, Farewell VT, Gladman DD, Urowitz MB: Kidney biopsy in systemic lupus erythematosus. III. Survival analysis controlling for clinical and laboratory variables. *Arthritis Rheum* 1994;37:559-567.
- (23) Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJ, Mysler E, Elkon KB: Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:1735-1737.
- (24) Jodo S, Kobayashi S, Kayagaki N, Ogura N, Feng Y, Amasaki Y, Fujisaku A, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Koike T: Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 1997;107:89-95.

- (25) Migita K, Eguchi K, Kawabe Y, Nakamura T, Shirabe S, Tsukada T, Ichinose Y, Nakamura H, Nagataki S: Apoptosis induction in human peripheral blood T lymphocytes by high-dose steroid therapy. *Transplantation* 1997; 63:583-587.
- (26) Zhang W, Hu G, Estey E, Hester J, Deisseroth A: Altered conformation of the p53 protein in myeloid leukemia cells and mitogen-stimulated normal blood cells. *Oncogene* 1992;7:1645-1647.
- (27) Wu J, Wang M, Li X, Sheng Y: Conformation changes of p53 proteins in regulation of murine T lymphocyte proliferation. *Cell Mol Res* 1993;39:27-31.
- (28) Kuhn HM, Kromminga A, Flammann HT, Frey M, Layer P, Arndt R: p53 autoantibodies in patients with autoimmune diseases: a quantitative approach. *Autoimmunity* 1999;31:229-235.
- (29) Herkel J, Mimran A, Erez N, Kam N, Lohse AW, Marker-Hermann E, Rotter V, Cohen IR: Autoimmunity to the p53 protein is a feature of systemic lupus erythematosus (SLE) related to anti-DNA antibodies. *J Autoimmun* 2001;17:63-69.

**FIGURE 1:** Levels of p53 of SLE patients and control group.



**FIGURE 2:** Levels of p53 of active (SLEDAI > 7) and inactive (SLEDAI < 8) SLE patients and control group



### **5.3.1. SINTESIS DE LOS RESULTADOS MAS DESTACADOS**

#### **1- Relación de p53 con la presencia de enfermedad lúpica**

- Los pacientes con LES tienen niveles sanguíneos más elevados de p53 que el grupo control.

#### **2- Relación de p53 con la actividad de la enfermedad**

- Los pacientes con lupus activo tienen niveles de p53 mayores que los pacientes con LES en fase inactiva.
- Los niveles de p53 se correlacionan con el índice de actividad (SLEDAI), con los títulos de anticuerpos anti-DNA y con los niveles de IL-10.
- Los niveles de p53 elevados en los pacientes lúpicos activos e inactivos no están influenciados por la presencia de nefropatía.

#### **3- Relación de p53 con el tratamiento recibido**

- No hay relación entre los niveles de p53 y el tipo de tratamiento recibido.
- Los niveles de p53 tampoco se correlacionan con la dosis de glucocorticoides recibida.

#### **4- Relación entre los distintos parámetros (p53, sFas, TNF-alfa, Bcl-2 y IL-10)**

- Existe correlación entre los niveles de p53 y IL-10.
- No hay correlación entre los niveles de p53 y TNF-alfa, entre p53 y Bcl-2, ni entre los niveles de p53 y sFas, respectivamente.

### **5.3.2. CONCLUSIONES PARCIALES**

- 1- Los niveles sanguíneos de la proteína p53 están elevados en los pacientes lúpicos, por lo que parece tener relación con la patogenia de esta enfermedad.
  
- 2- La correlación de p53 con los otros parámetros de actividad (SLEDAI, anticuerpos anti-DNA, niveles de IL-10) sugiere que los niveles de p53 son también un buen parámetro de actividad en el LES.
  
- 3- IL-10 podría influir en la actividad del LES a través de interferir en la vía apoptótica de p53, al estimular la presencia de niveles elevados de esta proteína en sangre periférica.



## **VI. DISCUSION**

## **6. DISCUSION**

Múltiples genes y citocinas parecen interactuar entre sí para determinar un efecto final sobre la vida o la muerte de una célula o conjunto de ellas, con lo que ello implica en el contexto de la autoinmunidad. Nuestros estudios se han basado en la enfermedad autoinmune por excelencia, el lupus eritematoso sistémico.

Como ya introdujimos al hablar de las enfermedades autoinmunes en general, en el LES, algunos oncogenes (*fas*, *bcl-2*, *p53*...) y citocinas (IL-10, TNF-alfa...) juegan un papel importante en la regulación de la apoptosis de los linfocitos autorreactivos<sup>37-46</sup>.

### **Interrelación entre el sFas y el TNF-alfa:**

Fas/APO1 es una proteína de la superficie celular que induce apoptosis en los linfocitos de los pacientes lúpicos. Así, se han encontrado niveles séricos elevados de la fracción soluble del Fas (sFas), que es la fracción extracelular del rFas<sup>47-51</sup>. Esto sugiere que sFas bloquea la apoptosis de los linfocitos activados, lo que contribuye a la aparición de los fenómenos autoinmunes propios del LES<sup>23</sup>. Diversos estudios sugieren que TNF-alfa puede interferir en la apoptosis de los pacientes lúpicos al inhibir la función del rFas<sup>52-53</sup>.

En nuestros trabajos hemos objetivado niveles séricos elevados de TNF-alfa y sFas, los cuales tienen una correlación entre ellos. Tal como se ilustra en la Figura 7, el TNF-alfa, el cual está sobreexpresado en condiciones de inflamación como ocurre en el LES, podría interferir en la vía apoptótica del

Fas, al provocar la presencia de sFas en estos pacientes, quizás a través de inducir la delección de la fracción extracelular de esta proteína. El sFas presente en el suero de estos pacientes, que no es más que la fracción extracelular de rFas, donde interacciona su ligando en condiciones normales, bloquearía la unión del ligando con el receptor intacto. Ello produciría una deficiente apoptosis de los linfocitos autorreactivos, y favorecería la aparición de fenómenos autoinmunitarios.

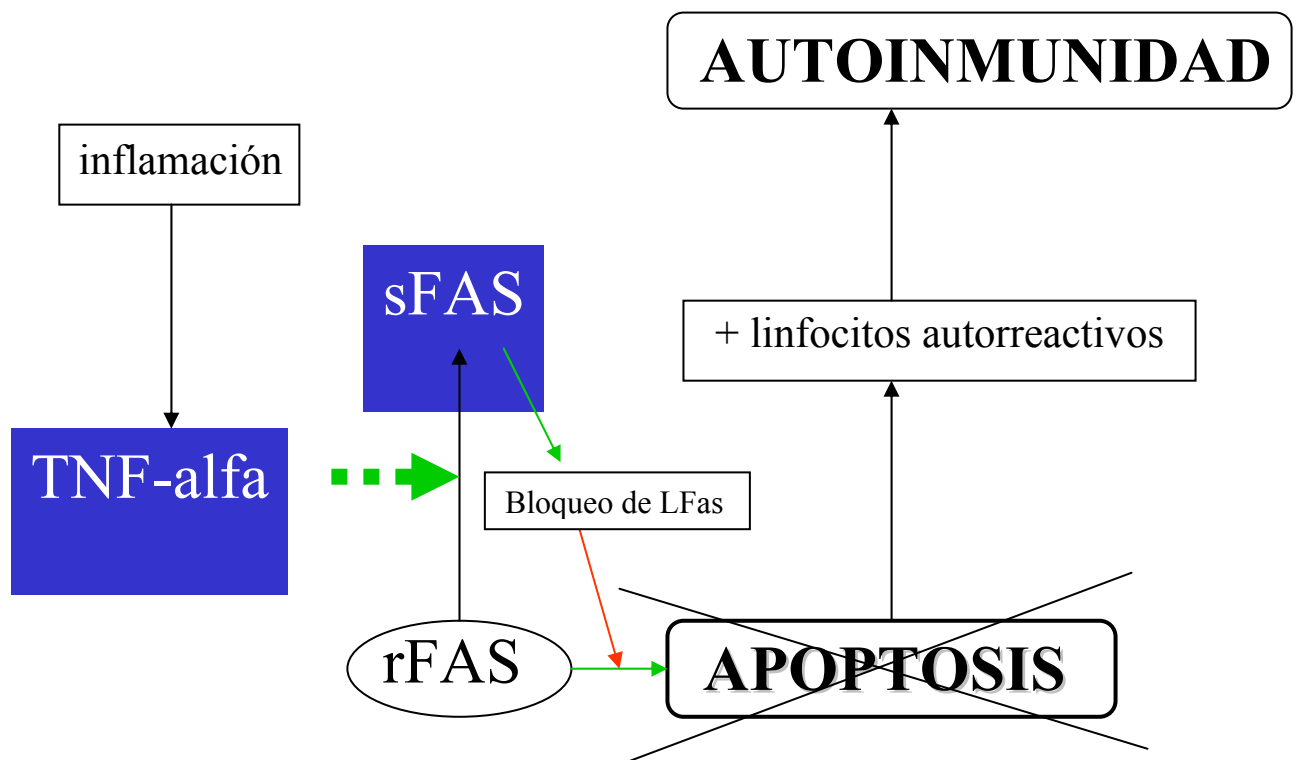


Figura 7: relación de sFas y TNF-alfa con la apoptosis de los linfocitos autorreactivos en el LES

**Interrelación entre el sFas, Bcl-2 y IL-10:**

Se ha observado una buena correlación entre la población de linfocitos autorreactivos que sobreexpresan Bcl-2 y la presencia de actividad en el LES. Ello sugiere que los niveles elevados de Bcl-2 en estas células puede favorecer su supervivencia<sup>54</sup>. Esto ocurre, al menos en parte, por la interferencia de Bcl-2 sobre la vía apoptótica del Fas<sup>55</sup>.

Varios estudios muestran que la IL-10 contribuye a inhibir la apoptosis de las células autorreactivas en los pacientes lúpicos, a través de aumentar la expresión de Bcl-2 en estas células<sup>56-59</sup>. Además, la expresión de IL-10 y Bcl-2 se ha relacionado con la actividad de la enfermedad<sup>60-66</sup>.

Los resultados obtenidos en nuestros trabajos corroboran estos hechos (Figura 8). En nuestros pacientes, hemos objetivado que la expresión de IL-10 y Bcl-2 está relacionada con el mantenimiento de la actividad en el LES. La correlación hallada entre los niveles de Bcl-2 y sFas sugiere que, igual como ocurre con el TNF-alfa, un posible mecanismo de acción de Bcl-2 sobre la vía apoptótica del Fas sea a través de estimular la delección de la región extracelular de rFas, con el consiguiente aumento de los niveles de sFas. Esto contribuiría a inhibir la función pro-apoptótica de rFas a través de bloquear sus receptores (Fas ligando), lo que favorecería la supervivencia de los linfocitos autorreactivos. La deficiente apoptosis de los linfocitos autorreactivos en estos pacientes facilitaría la aparición de los fenómenos autoinmunes propios del LES.

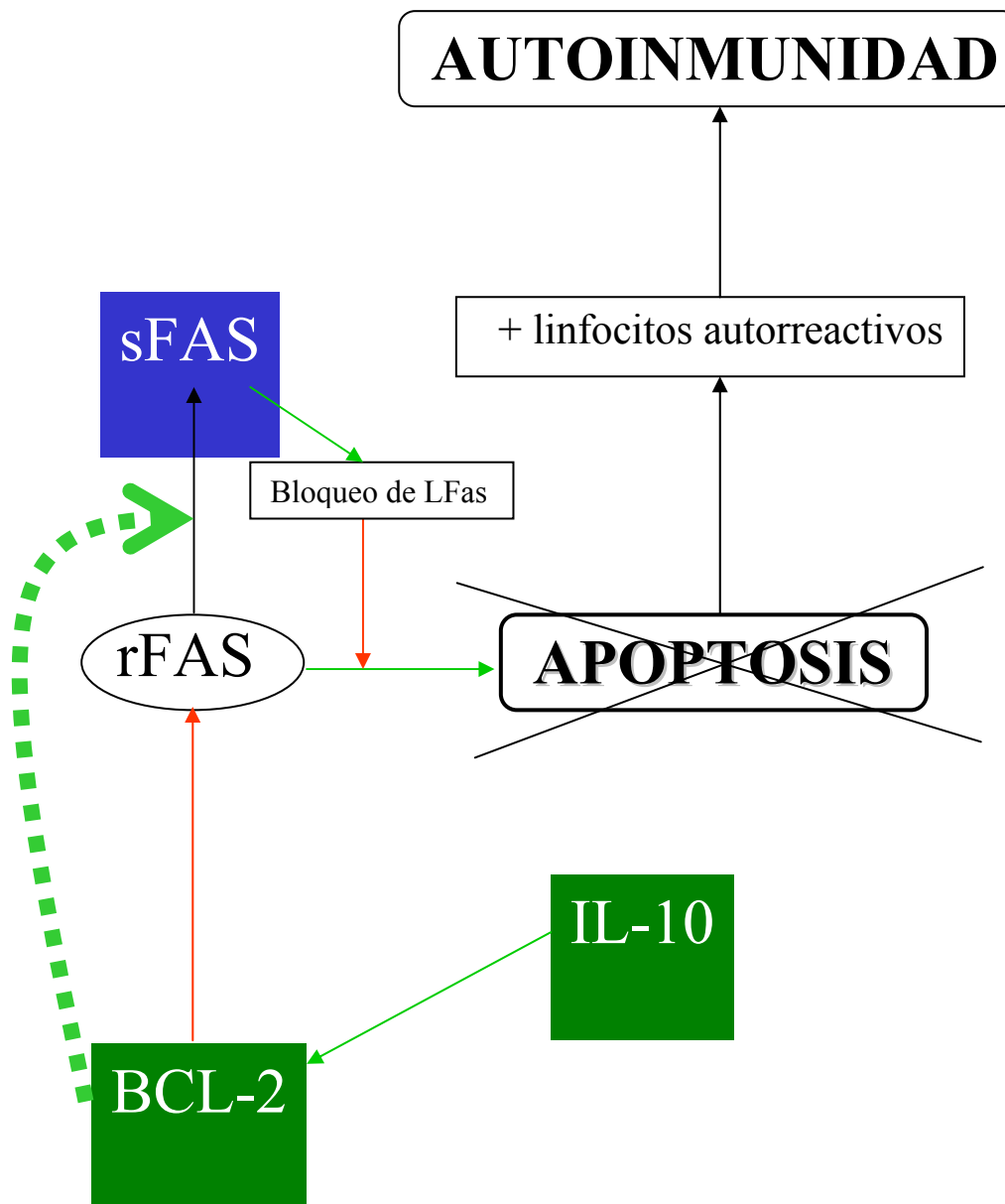


Figura 8: relación de bcl-2 y IL-10 con la apoptosis en el LES.

**Interrelación de p53 con IL-10:**

Se ha sugerido que un cambio conformacional del oncogén p53 producido por mutación podría producirse durante la activación celular, lo que resultaría en la formación de un neoantígeno con una vida media más prolongada<sup>67-68</sup>. Esto

explicaría que, en nuestros pacientes lúpicos hayamos encontrado niveles elevados de la proteína p53 en sangre periférica, lo cual no ha sido descrito hasta la actualidad en la literatura; y la presencia de anticuerpos anti-p53 en el suero de los pacientes estudiados por otros autores<sup>69-73</sup>.

La autoinmunidad frente al DNA es controvertida, ya que el material genético por sí mismo es póbrememente inmunogénico. Es por esto que el antígeno que provoca la reacción autoinmune frente al DNA, con la consiguiente aparición de anticuerpos anti-DNA característica en el LES, probablemente no es el propio DNA. En este camino, estudios recientes muestran la existencia de anticuerpos anti-p53 en los pacientes lúpicos<sup>69-71</sup>. La proteína p53 tiene un dominio que reconoce el DNA dañado. En el curso de la respuesta inmune frente a p53, se formarían anticuerpos contra este dominio de p53, con lo que estos anticuerpos mimetizarían inmunológicamente la estructura del DNA dañado. Estos anticuerpos inmunológicamente idénticos al DNA serían los responsables de la inducción de la formación de anticuerpos anti-DNA, en lugar del propio DNA. A su vez, los anticuerpos anti-DNA y anti-p53 pueden bloquear funcionalmente la activación de p53 por competencia con su dominio, y reducir así la apoptosis de las células autorreactivas<sup>72-73</sup>.

En nuestros pacientes lúpicos hemos encontrado correlación entre los niveles de p53 y anticuerpos anti-DNA, lo que apoya esta hipótesis. Como se ilustra en la Figura 9, la correlación que hemos objetivado entre los niveles de IL-10 y p53 sugiere que esta interleucina (IL-10) podría inducir la presencia de niveles elevados de p53 en sangre periférica, quizás a través de la inducción del neoantígeno p53 antes mencionado, con una vida media más prolongada.

Como hemos mencionado, este hecho induciría la producción de anticuerpos anti-p53, que inhibirían la función de p53, por un mecanismo de unión antígeno-anticuerpo, y a través de la inducción de la formación de anticuerpos anti-DNA. La inhibición de la vía apoptótica de p53 favorecería la supervivencia anómala de los linfocitos autorreactivos en los pacientes con LES, lo que

# AUTOINMUNIDAD

provocaría la aparición de fenómenos autoinmunes.

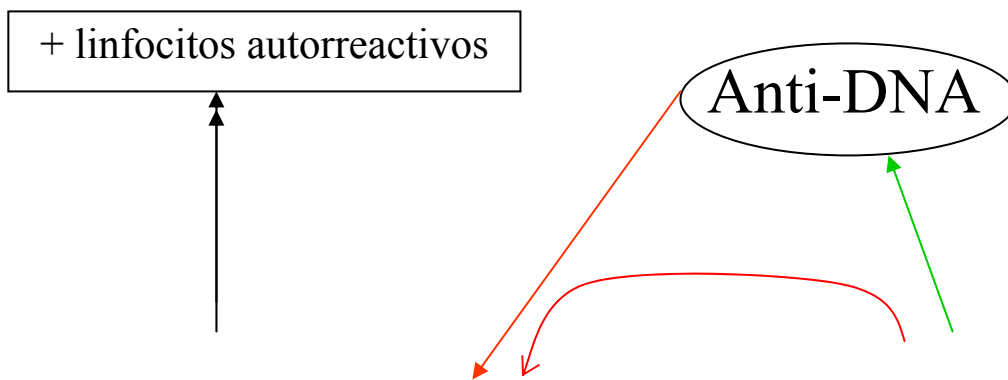
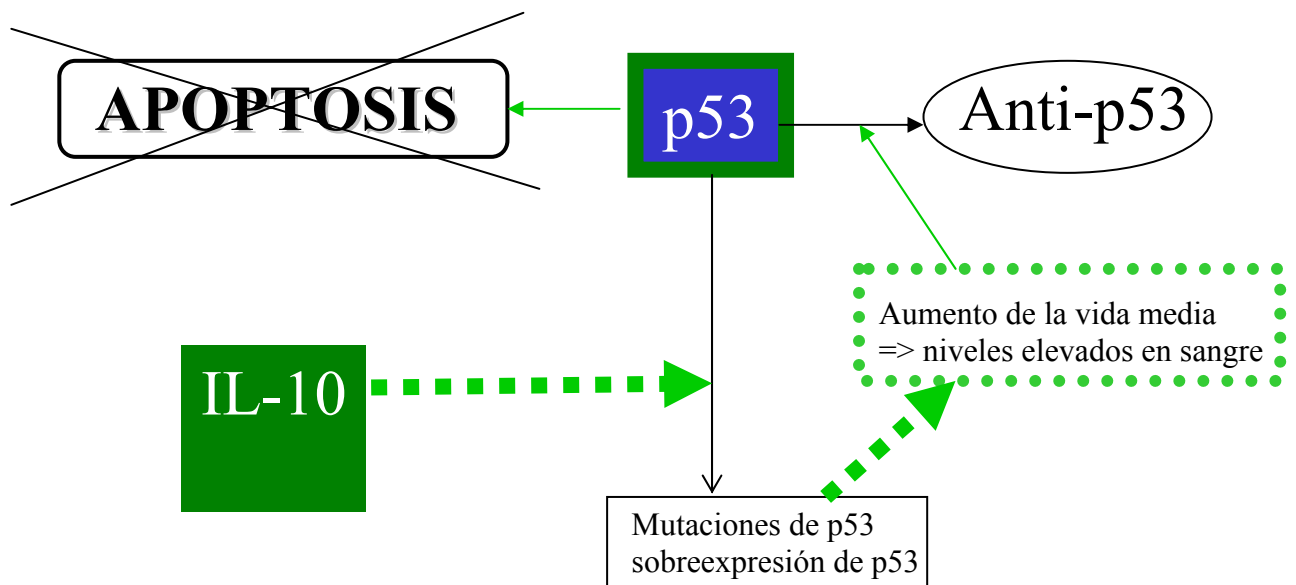


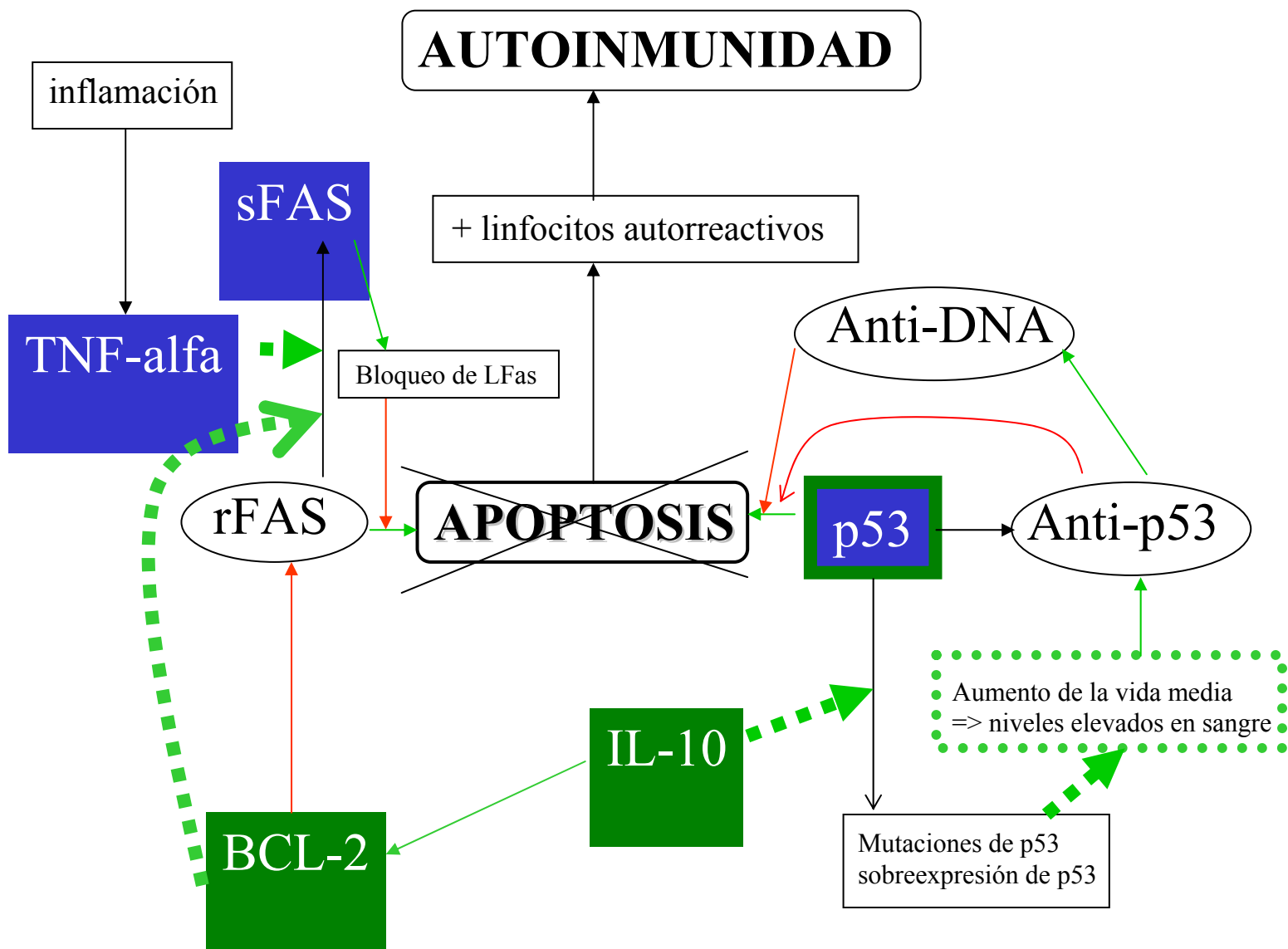
Figura 9: Relación de p53 con la apoptosis de los linfocitos autorreactivos en el



LES

**Interrelación entre todos los parámetros estudiados (sFas, Bcl-2, TNF-alfa, IL-10 y p53):**

Por último, en la Figura 10 se da una visión global de la interconexión de las distintas vías apoptóticas y los datos obtenidos en los diferentes trabajos de esta tesis doctoral, que hemos comentado con anterioridad de forma pormenorizada.





*Figura 10: relación de sFas, TNF-alfa, IL-10, bcl-2 y p53 con la apoptosis de los linfocitos autorreactivos en el LES*

Se puede observar de forma más clara, cómo las alteraciones de las vías apoptóticas del Fas y de p53 tienen una acción directa sobre la patogenia de la enfermedad lúpica y, cómo éstas vías están interrelacionadas entre sí por distintas moléculas como la oncoproteína Bcl-2, la fracción soluble del Fas (sFas) y las interleucinas IL-10 y TNF-alfa.

## **VII. CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONES PARCIALES**

- 1- Las proteínas sFas, TNF-alfa y p53 se relacionan con la patogenia del LES.
- 2- Las proteínas Bcl-2, IL-10 y p53 se relacionan con la actividad de la enfermedad lúpica.
- 3- Bcl-2 y TNF-alfa influyen en la disregulación apoptótica al interferir la vía del Fas. Ello provocaría la liberación en sangre periférica de la fracción extracelular del receptor Fas en forma soluble. Este Fas soluble inhibiría la vía apoptótica del Fas mediante el bloqueo de los receptores del propio Fas.
- 4- IL-10 influye en la actividad de la enfermedad lúpica al favorecer la presencia de niveles elevados de p53 en sangre periférica.

## CONCLUSION FINAL

Los oncogenes *fas*, *bcl-2* y *p53*, las citocinas IL-10 y TNF-alfa, y la fracción proteica soluble del Fas tienen una notable importancia en la patogenia y la actividad de la enfermedad lúpica.

Las vías apoptóticas del Fas y p53 son independientes entre sí. Sin embargo, diversas citocinas (IL-10, TNF-alfa), oncoproteínas (Bcl-2) y fracciones proteicas solubles (sFas) pueden ser las encargadas de relacionarlas entre sí. La interferencia de estas vías apoptóticas produciría una eliminación deficiente de los linfocitos autorreactivos. Ello favorecería su supervivencia, lo que provocaría las alteraciones de disregulación inmunológica propias del LES.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

## **8. BIBLIOGRAFIA**

1- Hess EV, Farhey Y. Etiology, environmental relationships, epidemiology, and genetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7: 371-375.

2- Drake CG and Kotzin BL. Genetic and immunological mechanisms in the pathogenesis of systemic lupus erithematosus. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 733-740.

3- Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T. Autimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994; 10: 1415-1420.

4- Vivancos J, Viñas O, Font J. La apoptosis. *Med Integral* 1995; 25: 357-366.

5- Hockenbery D. Defining Apoptosis. *Am J Phatol* 1995; 146: 16-19.

6- Fournie G: Cell death and lupus. *Ann Med Interne* 1996; 147: 472-479.

7- Salmon M, Gordon C: The role of apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 1999; 38: 1177-1183.

8- Adamczyk M, Kostka G, Palut D: The role of apoptosis in cell physiology and pathology. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1998; 49: 415-432.

9- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima SI, Sameshima M et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen *fas* can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243.

10- Vaishnaw AK, Toubi E, Ohsako S, Drappa J, Buys S, Estrada J, et al: The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/APO-1) mutations. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1833-1842.

11- Peter ME, Dhein J, Ehret A, Hellbardt S, Walczak H, Moldenhauer G et al. APO-1 (CD95)-dependent and -independent antigen receptor-induced apoptosis in human T and B cell lines. *Intern Immunol* 1995; 7: 1873-1877.

12- Font J, Vivancos J. Apoptosis y enfermedades autoinmunes. *Med Clin* 1996: 619-621.

13- Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 1993; 14: 338-339.

14- Binder C and Hiddemann W. Programmed cell death: many questions still to be answered. *Ann Hematol* 1994; 69: 45-55.

15- Mezquita C. Oncogenes y genes supresores. *Med Clin* 1995; 105: 389-395.

16- Talal N. Oncogenes, autogenes and rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1421-1422.

17- Green DR, McGahon A, Martin SJ. Regulation of apoptosis by oncogenes. *J Cell Biochem* 1996; 60: 33-38.

18- Talal N. Concluding remarks: autogenes and oncogenes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 72: 208-209.

19- Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A: Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 2001; 488: 211-231.

20- Ghidotti GG, Urbani S, Alfieri R. Genetic control of apoptosis. *Fund Clin Immunol* 1995; 3: 56-58.

21- Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kalleberg CGM: Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. *Lupus* 2001; 10: 866-872.

22- Mandik L, Nguyen KT, Erikson J. fas receptor expression on B-lineage cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3148-3154.



23- 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.

24- Kovacs B, Szentendrei T, Bednarek JM, Pierson MC, Mountz JD, Vogelgesang SA, et al: Persistent expression of a soluble form of Fas/APO1 in continuously activated T cells from a patient with SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15: 19-23.

25- Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hasimoto H: Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1126-1129.

26- Harris CC and Hollstein M. Clinical implications of the *p53* tumor-suppressor gene. *N E J Med* 1993; 329: 1318-1327.

27- Soussi T. The *p53* tumour supressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Molec Med Today* 1996; pp32-37.

28- Park JR and Hockenbery M. *bcl-2*, a novel regulator of apoptosis. *J Cell Biochem* 1996; 60: 12-17.

29- Akbar AN, Salmon M, Savill J, Janossy G. A possible role for *bcl-2* in regulating T-cell memory - a 'balancing act' between cell death and survival. *Immunol Today* 1993; 14: 526-531.

30- Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of *bcl-2* on *fas* antigen-mediated cell death. *J Immunol* 1993; 151: 621-627.

31- Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, Kiener H, Prestler E, Jaeger U et al. High levels of *bcl-2* protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1423-1430.

32- Gatenby PA, Irvine M: The *bcl-2* proto-oncogene is overexpressed in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 1994; 7: 623-631.

33- Ohsako S, Hara M, Harigai M, Fukasawa C, Kashiwazaki S. Expression and function of *fas* antigen and *bcl-2* in human systemic erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunophatol* 1994; 73: 109-114.

34- Graninger WB: Transcriptional overexpression of the proto-oncogene *bcl-2* in patients with systemic lupus erythematosus. *Wien Klin Wochenschr* 1992; 104: 205-207.

35- Ho CY, Wong CK, Li EK, Lam WK: Effects of dexamethasone on the expression of Fas molecules and apoptosis of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest* 2001; 30: 231-243.

36- Seki M, Ushiyama C, Seta N, Abe K, Fukazawa T, Asakawa J, et al: Apoptosis of lymphocytes induced by glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 823-830.

37- Gmelig-Meyling F, Dawisha S, Steinberg AD: Assessment of in vivo frequency of mutated T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1992;175:297-300.

38- Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM, et al: CD95 (Fas) – dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 1995; 376: 181-184.

39- Amasaki Y, Kobayashi S, Takeda T, Ogura N, Jodo S, Nakabayashi T, et al. Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 245-250.

40- Mysler E, Bini P, Drappa J, Ramos P, Friedman SM, Krammer PH, et al: The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994; 93: 1029-1034.

41- Huang QR, Morris D, Manolios N: Evaluation of the Bcl-2 gene locus as a susceptibility locus linked to the clinical expression of systemic lupus erythematosus (SLE). *Rheumatol Int* 1996; 16: 121-124.

42- Tsao BP: Genetic susceptibility to lupus nephritis. *Lupus* 1998; 7: 585-590.

43- Mehrian R, Quismorio FP Jr, Strassmann G, Stimmler MM, Horwitz DA, Kitridou RC, et al: Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 596-602.

44- 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.

45- Contasta I, Pellegrini P, Berghella AM, Adorno D: Cell cycle control in cellular homeostasis during the immune response: interactions between TH1, TH2 cytokines, and Bcl-2 and p53 molecules. 2001; 16: 63-71.

46- Navratil JS, Ahearn JM: Apoptosis, clearance mechanisms, and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3: 191-198.

47- Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA: Elevated soluble fas production in SLE correlates with HLA status not with disease activity. *Lupus* 1997; 6: 717-722.

48- Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, McConnell J, Kennedy RJ, Bell AL: Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. *Lupus* 1999;8:508-513.

49- Tokano Y, Miyake S, Kayagaki N, Nozawa K, Morimoto S, Azuma M, et al: Soluble Fas molecule in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 1996; 16: 261-265.

50- Lopik T, Bijl M, Hart M, Boeije L, Gesner T, Creasy AA, et al: Patients with systemic lupus erythematosus with high plasma levels of sFas risk relapse. *J Rheumatol* 1999; 26: 60-67.

51- Jodo S, Kovayashi S, Kayagaki N, Ogura N, Feng Y, Amasaki Y, et al: Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 89-95.

52- Wang M, Dong Y, Huang S: Study of the association between tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1999;38:393-396.

53- Aringer M, Feierl E, Steiner G, Stummvoll GH, Hofler E, Steiner CW, Radda I, Smole JS, Graninger WB: Increased bioactive TNF in human systemic lupus erythematosus: associations with cell death. *Lupus* 2002;11:102-108.

54- Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA: Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review. *Br J Rheumatol* 1997;36:158-163.

55- Korsmeyer SJ: Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol Today* 1992;13:285-288.

56- Mehrian R, Quismorio FP Jr, Strassmann G, Stimmler MM, Horwitz DA, Kitridou RC, Gauderman WJ, Morrison J, Brautbar C, Jacob CO: Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41:596-602.

57- Cohen SB, Crawley JB, Kahan MC, Feldmann M, Foxwell BM: Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. *Immunology* 1997;92:1-5.

58- Weber-Nordt RM, Henschler R, Schott E, Wehinger J, Behringer D, Mertelsmann R, Finke J: Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;88:2549-2558.

59- Levy Y, Brouet JC: Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of bcl-2 protein. *J Clin Invest* 1994;93:424-428.

60- Hase K, Tani K, Shimizu T, Ohmoto Y, Matsushima K, Sone S: Increased CCR4 expression in active systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol* 2001;70:749-755.

61- Liu Y, Yin P, Zhao X: Clinical significance and expression of Bcl-2 protein in patients with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1999;38:94-97.

62- Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renaud JC: Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* 1995;4:393-395.

63- Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH: Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:283-288.

64- Van der Linden MW, Westendorp RG, Sturk A, Bergman W, Huizinga TW: High interleukin-10 production in first-degree relatives of patients with generalized but not cutaneous lupus erythematosus. *J Investig Med* 2000; 48: 327-334.

65- Llorente L, Richaud-Patin Y, Garcia-Padilla C, Claret E, Jakez-Ocampo J, Cardiel MH, et al: Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1790-1800.

66- Widner B, Sepp N, Kowald E, Ortner U, Wirleitner B, Fritsch P, et al: Enhanced tryptophan degradation in systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 2000; 201: 621-630.

67- Zhang W, Hu G, Estey E, Hester J, Deisseroth A: Altered conformation of the p53 protein in myeloid leukemia cells and mitogen-stimulated normal blood cells. *Oncogene* 1992;7:1645-1647.

68- Wu J, Wang M, Li X, Sheng Y: Conformation changes of p53 proteins in regulation of murine T lymphocyte proliferation. *Cell Mol Res* 1993;39:27-31.

69- Herkel J, Erez-Alon N, Mimran A, Wolkowicz R, Harmelin A, Ruiz P, Rotter V, Cohen IR: Systemic lupus erythematosus in mice, spontaneous and induced,



is associated with autoimmunity to the C-terminal domain of p53 that recognizes damaged DNA. *Eur J Immunol* 2000;30:977-984.

70- Kuhn HM, Kromminga A, Flammann HT, Frey M, Layer P, Arndt R: p53 autoantibodies in patients with autoimmune diseases: a quantitative approach. *Autoimmunity* 1999;31:229-235.

71- Kovacs B, Patel A, Hershey JN, Dennis GJ, Kirschfink M, Tsokos GC: Antibodies against p53 in sera from patients with systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 980-982.

72- Erez-Alon N, Herkel J, Wolkowicz R, Ruiz PJ, Waisman A, Rotter V, et al: Immunity to p53 induced by an idiotypic network of anti-p53 antibodies: generation of sequence-specific anti-DNA antibodies and protection from tumor metastasis. *Cancer Res* 1998; 58: 5447-5452.

73- Herkel J, Mimran A, Erez N, Kam N, Lohse AW, Marker-Hermann E, Rotter V, Cohen IR: Autoimmunity to the p53 protein is a feature of systemic lupus erythematosus (SLE) related to anti-DNA antibodies. *J Autoimmun* 2001;17:63-69.

## IX. INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Descripción del proceso de apoptosis.....</i>	9
<i>Figura 2: Esquema de las principales funciones de las interleukinas relacionadas con la etiopatogenia de la autoinmunidad.....</i>	17
<i>Figura 3: Mecanismo de acción del Fas .....</i>	19
<i>Figura 4: Mecanismo de acción de p53.....</i>	20
<i>Figura 5: Mecanismo de acción de bcl-2.....</i>	21
<i>Figura 6: Interrelación entre los distintos oncogenes.....</i>	22
<i>Figura 7: Relación de sFas y TNF-alfa con la apoptosis de los linfocitos autorreactivos en el LES.....</i>	67
<i>Figura 8: Relación de Bcl-2 y IL-10 con la apoptosis de los linfocitos autorreactivos en el LES.....</i>	69
<i>Figura 9: Relación de p53 con la apoptosis de los linfocitos autorreactivos en el LES.....</i>	71

*Figura 10: relación de sFas, alfa-TNF, IL-10, bcl-2 y p53 con la apoptosis de los linfocitos autorreactivos en el LES..... 72*