



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SOCS1 EN LUPUS ERITEMATOSO
SISTÉMICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
GABRIELA LUCILA RAMÍREZ VÉLEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICO
COMITÉ TUTOR
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. CONSTANTINO LÓPEZ MACÍAS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

MÉXICO, D. F. JULIO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



A mi abuelito Tetín, por haber creído SIEMPRE en mí.

ÍNDICE	Pág
	•
Agradecimientos	4
Tabla de abreviaturas	6
Resumen	7
Antecedentes	8
Introducción	9
Historia del LES	10
Definición y epidemiología del LES	10
Patogénesis del LES	12
Células del sistema inmunitario	12
Poliformismos	13
Defectos en eliminación de IC y células apoptóticas	13
Citocinas	14
IFN tipo I en LES	15
Sistema de interferones	19
Vía de señalización Jak/STAT	20
Señalización de los IFN tipo I a través de Jak/STAT	21
Sello de IFN	22
Genes estimulados por interferón (ISG)	22
Factores reguladores de IFN (IRF)	24
Citocinas	24
Apoptosis	24
Regulación negativa de la vía de señalización Jak/STAT	25
Familia SOCS	25
SOCS1	26
Hipótesis	30
Objetivos generales	31
Objetivos particulares	32
Materiales y métodos	33
Pacientes	34
Estímulos “ <i>in vitro</i> ” con IFN tipo I	35
Determinación de IFN I en suero	35
Muestras de plasma y estímulo de CMN	35
Extracción de proteínas y western blot	36
Coinmunoprecipitación	37
Extracción de RNA total y RT-PCR tiempo real	37
Análisis de miRNA-155	38
Análisis estadístico	38
Tabla 1. Pacientes con LES	39
Resultados	40
Fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2 en LES	41
Expresión disminuida de SOCS1 en LES	49
Actividad similar a IFN en el plasma de LES	58
Asociación entre la disminución de SOCS1 y la fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2 en LES	62
Asociación ligando-dependiente de SOCS1 con IFNAR2 y constitutiva con IFNAR1	63
Expresión de miRNA-155 en LES	65
Discusión	66
Conclusiones y perspectivas	72
Apéndice I	74
Referencias	75

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo y mejor amigo, Abraham, por haber estado conmigo siempre, por haberse involucrado tanto en mi proyecto que terminó siendo coautor, porque sin él no hubiera tenido la fuerza de enfrentar todas las adversidades que se presentaron en mi camino. Por haberme hecho reír, haberme apoyado y consolado cuando creía que no había más solución. Muchas gracias, una dedicatoria es simplemente un pequeño homenaje a todo lo que eres para mí.

A mi mami, porque siempre estuvo pendiente de lo que pasaba, los problemas y los éxitos que tenía a lo largo no sólo de esta etapa, sino de toda mi vida. Muchas gracias por tu apoyo, tus palabras, y todo lo que has hecho por mí. Gracias a ti soy la persona de hoy.

A mi papi, por haberme dado la oportunidad de tener una buena educación y por su apoyo. Muchas gracias, te quiero mucho, y ojalá que las noches de pláticas y complicidad sean más que un recuerdo lejano.

A Alebrix, por todo su apoyo y por ser mi compañera y mi cómplice de tantas aventuras. Todo lo que hago lo hago con el afán de que te sientas orgullosa de ser mi hermanita. El cariño que siento por tí trasciende las barreras del tiempo y el espacio.

Al Dr. José Moreno Rodríguez, por haberme tenido la confianza y aceptarme en su unidad para hacer mi servicio social y el Doctorado. Por impartirme el gusto por la ciencia y la mayoría de los conocimientos que poseo ahora. Por haber guiado mi camino hasta la culminación de la meta final. Gracias por ser mi tutor y mi amigo.

A la Dra. María Campos, por todo su apoyo y las pláticas que compartimos. Por haberme ayudado tanto no sólo en lo académico, sino en lo moral. Gracias por sus enseñanzas de la vida y por su amistad.

A mis mejores amigos de hace más de una década, Mike, Mar, Clark, Xim y Abraham, por ser parte primordial de mi vida desde que los conocí, por compartir conmigo los momentos más divertidos y por estar conmigo en todo momento.

A mis amigos de la UIMEA: Gibrán, David, Luzma, Tania, Aniela, Rosita, Iliana, Octavio, Marcela. A Paty R. y Paty Q. Por hacerme cambiar la idea de que las verdaderas amistades solamente se conocen en la Universidad, porque pasaron

de ser mis compañeros de trabajo en la unidad a mis amigos de verdad, mis cómplices y apoyo.

A la Dra. Laura, por dejarme quedarme en su laboratorio y hacerme sentir como una más de sus alumnas. Después de todo este tiempo de conocerla y platicar conmigo, la considero como una amiga.

Al Dr. Constantino y el Dr. Ortega, por haberme ayudado y guiado en este proceso. Gracias por sus enseñanzas y consejos.

A mis amigos de la UIMF: Dra. Martha, Dr. Christian y Eunice, por todo el apoyo que me brindaron, por platicar conmigo y ayudarme a tener paciencia y por haberme apoyado en la realización de mis experimentos y por prestarme reactivos.

A mi familia, porque todos y cada uno de ustedes ha tenido algo que ver en la obtención de este logro. Agei, Betty, Afe, Nunu, Gloria, Anita, Laura, Javier. Gracias por quererme tanto. A mis primos Alfre, Jorge y Carlos, porque aunque no los vea tan seguido siempre se siente su presencia en mi vida, y cuando los veo es como si nunca nos hubiéramos separado. Me divierto muchísimo con ustedes.

A todas las personas que han dejado su huella en mí y son parte de este logro desde otra dimensión (Camen, Mache y Tetín). Siempre los recuerdo con mucho cariño.

A todos los que de una o de otra forma, en el presente o pasado, directa o indirectamente han contribuido a que yo logre lo que me propongo, o a que vea la vida de la manera en la que lo hago. Porque la felicidad está hecha de sueños, y la vida es el camino para que los realicemos.

"La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad."

Julio Verne

Abreviaturas

Abreviatura	Significado	Descripción	Abreviatura	Significado	Descripción
IFN	Interferón	IFN tipo I: α , β , ω , τ , ϵ IFN tipo II: γ IFN tipo III: $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$	TLR	Receptor tipo Toll	TLR3, TLR7, TLR8, TLR9
LES	Lupus eritematoso sistémico		CPA	Células presentadoras de antígeno	
IFNAR	Receptor a IFN-I	Dos cadenas: IFNAR1 y IFNAR2	SLE-IF	Factor inductor de IFN en LES	
SOCS	Supresor of cytokine signalling	SOCS1-SOCS7	NK	Linfocitos natural killer	
CMN	Células mononucleares		CTL	Linfocitos T citotóxicos	
Jak	Janus kinase	Jak1-Jak3	MRL _{lpr lpr}	Murphy Roths large Lupus prone mice	
Tyk2	Tyrosine kinase 2		Poli-I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico	
STAT	Signal transducer actibator of transcription	STAT1-STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6	OAS	Oligoadenilato sintetasa	OASL: ligando 2'5'OAS
RNA	Ácido ribonucleico	mRNA: mensajero dsRNA: doble cadena miRNA: miro RNA	IFIT	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats	
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad	MCH I y MCH II	Mx	Myxovirus resistance	Mx1, Mx2, MxA
DNA	Ácido desoxirribonucleico	dsDNA: doble cadena	IRF	Interferon regulatory factor	IRF5, IR7, IRF9
ACR	Colegio Americano de Reumatología		AR	Artritis reumatoide	
ANA	Anticuerpos antinucleares		NIPC	Células naturales productoras de IFN	
DC	Células dendríticas	pDC: plasmacitoides	ISGF3	Interferon stimulated gene factor 3	
IC	Complejos inmunes		ISRE	Interferon stimulated response elements	
Ig	Inmunoglobulina	IgG, IgM	RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1	
FC γ RIIB	Receptor IIB a fracción constante de IgG		PKR	Protein Kinase R	
PD-1	Programmed death-1		EIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2 α	
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22		TRAIL	TNF _{related} apoptosis-inducing ligand	
CRP	Proteína C reactiva		FADD	Fas associated death domain	
TGF β	Transforming growth factor β		CIS	Cytokine inducible SH2 protein	
IL	Interleucina	IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-28a, IL-28b, IL-29	PIAS	Protein inhibitor of activated STAT	
IL-2R β	Receptor β a interleucina-2		KIR	Kinase inhibitory region	
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4		SLEDAI	Systemic lupus erythematosus disease activity index	
Bcl-2	B cell CLL/lymphoma-2		PVDF	Fluoruro de polivinilideno	
Fas	Apoptosis stimulating fragment		GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	

RESUMEN

Introducción. La sobre-expresión de genes inducidos por los interferones tipo I (IFN-I) es una característica común del lupus eritematoso sistémico (LES) y de sus modelos experimentales. Sin embargo, la participación de la sobreproducción de IFN-I endógeno en este padecimiento no es clara. En este trabajo exploramos la posibilidad de que la señalización alterada a través del receptor a IFN-I (IFNAR) y su inhibidor fisiológico SOCS1 pueda participar para dar el sello de IFN-I encontrado en pacientes con LES.

Métodos. Se obtuvieron lisados totales de células mononucleares de sangre periférica (CMN) de pacientes con LES con o sin actividad de la enfermedad y controles sanos, cultivados en presencia o ausencia del IFN-I, y se analizaron mediante inmunoprecipitación y/o western blot para examinar la expresión de IFNAR y el estado de las proteínas de señalización asociadas, Jak1 y STAT2, así como su relación con el inhibidor fisiológico de la vía de señalización (SOCS1) y con los niveles plasmáticos de IFN alfa.

Resultados. Los pacientes con LES, pero no los controles sanos, mostraron fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2, la cual no tuvo relación con la actividad de la enfermedad ni con los niveles séricos de IFN-I. Se encontró una disminución en la expresión de SOCS1 en LES, tanto libre como asociada a IFNAR, principalmente a nivel de mRNA de SOCS1, aún después del cultivo en presencia con IFN beta. Los plasmas de los pacientes con LES activo indujeron la expresión de genes dependientes de IFN-I.

Análisis de resultados. Los pacientes con LES tienen la vía de señalización de IFNAR constitutivamente activada, como se denota por la fosforilación de Jak1 y STAT2 aún en ausencia de estímulo externo. Ya que dicha activación no se debe a niveles elevados de IFN alfa en el suero de LES, proponemos que la disminución en la expresión del regulador principal de la vía, SOCS1, podría contribuir a la señalización aumentada de IFN-I en LES.

Conclusiones. Estas observaciones sugieren que el patrón génico característico de IFN-I asociado a LES podría ser debido a una regulación defectuosa de la señalización a través de IFNAR y no necesariamente a niveles anormales de IFN-I.

Antecedentes

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes afectan aproximadamente al 5% de la población humana, y las mujeres son mucho más propensas a padecerlas. Estas enfermedades pueden ser descritas como condiciones patológicas en las cuales el sistema inmunitario reacciona a los propios tejidos del huésped, y pueden estar mediadas directa o indirectamente por el sistema inmune adaptativo, ya sean linfocitos T o anticuerpos dirigidos contra uno o más componentes del organismo. El pronóstico de estas enfermedades ha mejorado mucho con el uso de diversos medicamentos como los glucocorticoides, pese a lo cual, algunas de estas enfermedades siguen teniendo una tasa elevada de mortalidad. Por lo tanto, es de vital importancia elucidar los eventos que conducen al desarrollo de la autoinmunidad, y de ser posible, encontrar opciones terapéuticas adecuadas.

La patogenia de las enfermedades autoinmunes es compleja y muy diversa, y aunque se han identificado diversos factores predisponentes, es necesaria la asociación de varios de ellos para que se desarrolle la enfermedad. Así, además de la presencia de clonas autorreactivas de linfocitos B y/o T y/o ruptura de la tolerancia, además del reconocimiento de antígenos propios por parte de estas células, deben concurrir factores adicionales de susceptibilidad, como predisposición genética, de las cuales la de mayor impacto es el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) [1], factores biológicos (hormonas sexuales, edad) [2] y factores exógenos físicos, químicos o biológicos (medio ambiente, medicamentos, luz ultravioleta) [3,4].

El lupus eritematoso sistémico (LES) generalmente se acepta como la enfermedad autoinmune sistémica clásica debido a su amplio espectro de anormalidades clínicas e inmunológicas [5,6]. En este trabajo, tomando como base el hallazgo de un patrón génico característico de sello de interferón (patrón de expresión genética caracterizado por una prominente sobreexpresión de genes que codifican mRNA inducidos por IFN-I) en pacientes con LES, se estudió la posible existencia de una alteración en la vía de señalización de IFN-I, y su repercusión en la patogénesis del LES.

HISTORIA DE LES

El lupus eritematoso sistémico (LES) no es una enfermedad de reciente aparición, y se ha sugerido que algunas lesiones cutáneas fueron descritas por Hipócrates bajo el término de *herpes esthiomenos*. Lupus, lobo en latín, fue asociado con una enfermedad en el siglo X, presumiblemente para describir lesiones cutáneas que recordaban una mordida de lobo. El reconocimiento del LES data de 1872, cuando William Osler publicó tres artículos describiendo una enfermedad que inicialmente llamó eritema exudativo multiforme, y fueron la pauta para identificar los síntomas cutáneos y viscerales de esta enfermedad. En las décadas posteriores se llevaron a cabo observaciones a lo que parecía ser un nuevo síndrome, pero la mayoría se enfocaron en describir nuevos síntomas de lo que parecía ser el mismo padecimiento descrito por Osler, aunque no se había logrado conformar el término Lupus Eritematoso Sistémico, ni se había podido describir como un padecimiento autoinmune [7]. En 1966, Tan et al. detectaron la presencia de anticuerpos anti-DNA en LES [8], y en 1969, Koffler encontró que la detección estos anticuerpos es un factor que podría ser específico para LES [9]. Sin embargo, fue hasta 1971 que la Asociación Americana de Reumatología (ACR) publicó los criterios preliminares de clasificación para LES, los cuales fueron desarrollados para estudios clínicos y no con fines diagnósticos. Mediante las sugerencias de mejora de dichos criterios, principalmente la incorporación de anticuerpos antinucleares (ANA), se llegó a la versión de 1982, incluyendo además nuevos criterios inmunológicos y algunas manifestaciones de órganos y sistemas [10]. Finalmente, en 1997 se publicó la actualización de los criterios para la clasificación de LES, mismos que siguen en uso hasta la fecha, en los cuales se incluye la presencia de anticuerpos antifosfolípido [11].

DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DEL LES

El LES es una enfermedad autoinmune generalizada, heterogénea, con afección multisistémica y de curso variable, con lesiones tisulares causadas por complejos inmunes que contienen autoanticuerpos (inmunocomplejos) [5,6]. Esta enfermedad tiene un amplio espectro de manifestaciones clínicas, entre las que se encuentran afecciones en la piel (eritema fotosensible en forma de alas de mariposa), sistema músculo esquelético (artritis, miositis), sistema nervioso (cefalea, ansiedad, crisis convulsivas, psicosis, etc.), riñón (nefritis lúpica), trastornos en el sistema inmune y hematológico, anemia, linfopenia,

trombocitopenia) y manifestaciones vasculares (vasculitis, aterosclerosis, hipertensión arterial, hiperlipidemia). Es característica de LES la presencia de una gran variedad de autoanticuerpos dirigidos contra múltiples componentes celulares, en especial intracelulares, siendo los más comunes los anticuerpos anti-DNA de doble cadena, aunque también se han encontrado anticuerpos contra nucleosomas, ribonucleoproteínas, histonas y antígenos nucleolares[12].

La prevalencia del LES en la población general varía de 4 a 250 casos por cada 100,000 habitantes. Sin embargo, estas estadísticas varían a través del mundo, encontrándose que en Norteamérica, Asia y en el norte de Europa afecta a 40 de cada 100,000 habitantes, con una mayor incidencia entre la población hispana y afroamericana [12]. El LES afecta predominantemente a mujeres en edad fértil (relación mujer:varón 9:1). Aparece sobre todo al final de la segunda década de vida del paciente y al principio de la tercera. Asimismo, el LES puede iniciar antes de la pubertad hasta en el 20% de los casos[13]. En México se estima una prevalencia de 0.06%, y una incidencia de 1.8-7.6 casos por 100,000 personas/año [14].

Los pacientes con LES cursan con periodos de remisión y de exacerbación (actividad) de la enfermedad, la cual puede ser desencadenada por diversos factores tales como exposición a la luz solar, infecciones, estrés, etc. [1,3,15]. El tratamiento del LES no es etiológico ni curativo, por lo que gran parte de la terapia está dirigida a disminuir la actividad de la enfermedad, y se dirige a controlar el proceso inflamatorio y la respuesta inmune. El tratamiento se basa en glucocorticoides, frecuentemente acompañados de drogas inmunosupresoras citotóxicas como ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato, etc., lo cual varía dependiendo del tipo de manifestación y el órgano o sistema afectado. Otros medicamentos como la hidroxicloroquina se usan para manifestaciones leves y su mecanismo de acción en la enfermedad es desconocido [16-19]. De cualquier forma, el objetivo principal del tratamiento es la disminución de la actividad, que en forma resumida podría considerarse como la magnitud del proceso inflamatorio total, hasta la remisión de la enfermedad, que es la ausencia de inflamación a cualquier nivel.

PATOGÉNESIS DEL LES

Células del sistema inmunitario

Las anomalías celulares en LES son numerosas y se encuentran íntimamente relacionadas con los antígenos y anticuerpos que forman los complejos inmunes (IC), los cuales proporcionan estímulo inflamatorio a las células dendríticas (DC), monocitos, neutrófilos y linfocitos T y B.

Con respecto a los linfocitos T, a pesar de que pacientes con LES cursan con una cuenta disminuida de estas células en sangre, comparada con individuos sanos, se ha demostrado un aumento en su activación y en su expresión de moléculas del MHC clase II. Debido a que los linfocitos T regulan la función de los linfocitos B y por lo tanto de ellos depende la maduración y perpetuación de la producción de autoanticuerpos, las anomalías de los linfocitos T son centrales en el desarrollo de la enfermedad [20].

Los linfocitos B también juegan un papel importante en LES; se ha encontrado un estado de hiperactividad de estas células, con la consiguiente producción de un gran número de autoanticuerpos. Los linfocitos B de pacientes con LES, después de su expansión clonal, producen autoanticuerpos que han llevado a cabo mutación somática, maduración de afinidad y cambio de isotipo de IgM a IgG, todo ello indicativo de una respuesta humoral dependiente de linfocitos T. A pesar de que se han llevado a cabo numerosos estudios acerca del funcionamiento de linfocitos B, especialmente en modelos de lupus en ratones, se desconocen los mecanismos precisos que causan la hiperactividad de linfocitos B y la producción de autoanticuerpos en pacientes con LES. Aún así, se sabe que otros factores deben conjuntarse para el desarrollo del LES [21,22].

La hiperactividad de los linfocitos B y T en LES podría deberse a fallas en la inducción de tolerancia en unos, otros o ambos[5]. La tolerancia es un término usado para describir la capacidad del sistema inmunitario para no reaccionar contra los antígenos propios [23]. La razón de este defecto se desconoce, y dado que la tolerancia depende del control de la activación de linfocitos T y B a múltiples niveles a través de mecanismos muy variados, prácticamente cualquier falla en alguna de las moléculas que participan en la inducción y mantenimiento de la tolerancia inmunológica puede asociarse a LES.

Polimorfismos

Como en otras enfermedades autoinmunes, los principales factores de susceptibilidad a LES se relacionan con polimorfismos en genes que codifican proteínas relacionadas con la inducción y mantenimiento de la tolerancia inmunológica, tales como CD22 [24], FcγRIIB [25], PD-1 [26,27], PTPN22 [28], entre otras; además de genes que codifican proteínas que participan en la remoción de restos tisulares y complejos inmunes como proteína C reactiva (CRP), factores iniciales de la vía clásica del complemento (C4 y C2), DNAsa I, etc. [32], tanto en modelos murinos como en pacientes con LES. Varios estudios han revelado que defectos en las moléculas reguladoras de la respuesta inmune TGF-β, IL-2Rβ y CTLA-4 [29-32] también pueden participar en el desarrollo de la enfermedad. El papel de ciertos alelos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en LES es menos claro, probablemente debido a que la heterogeneidad del padecimiento hace que existan varios alelos clase II asociados, lo cual diluye su significancia estadística [1].

Defectos en eliminación de IC y células apoptóticas

Como se mencionó, en LES también son frecuentes polimorfismos de genes que codifican proteínas de limpieza tisular. Desde el punto de vista funcional, algunas proteínas que llevan a cabo esta función, tales como los componentes C1q, C2 y C4a del complemento, la DNAsa I y la CRP, se encuentran en niveles bajos en el suero de los pacientes con LES, lo que provoca que los complejos inmunes, así como los restos de células muertas por apoptosis o necrosis (los cuales en individuos sanos son removidos rápidamente por fagocitosis), permanezcan en la circulación durante tiempo prolongado. Por lo tanto, los linfocitos B y T autorreactivos que no se hicieron tolerantes, pueden ser activados por las concentraciones elevadas de material apoptótico en un ambiente pro-inflamatorio [33]. Los autoantígenos pueden continuar induciendo la producción de autoanticuerpos por linfocitos B autorreactivos y, en consecuencia, aumentar el daño tisular [34-39].

Además de la limpieza tisular deficiente, en pacientes con LES se ha reportado un aumento en la tasa de apoptosis de linfocitos [40]. Los cuerpos apoptóticos contienen partículas que pueden actuar como autoantígenos, y consecuentemente,

los autoanticuerpos de pacientes con LES al unirse a los antígenos liberados durante la apoptosis, exacerbaban la reacción autoinmune [41]. Varios estudios han revelado que defectos en la expresión de genes relacionados con la apoptosis (Bcl-2, Fas) también pueden participar en el desarrollo de la enfermedad. Los individuos con una mutación en el gen CD95/Fas generalmente desarrollan una enfermedad similar al Lupus [42,43].

En resumen, el LES es un padecimiento heterogéneo en cuanto a su origen, en el que diversos defectos genéticos primarios llevan a una vía patogénica común, que produce daño tisular y un síndrome con características clínicas similares.

Citocinas

Finalmente, otro factor que se encuentra estrechamente relacionado con el desarrollo del LES, es un perfil alterado de secreción de citocinas en pacientes con esta enfermedad. Las citocinas son proteínas producidas durante la activación celular, y son de vital importancia para el desarrollo y regulación de la respuesta inmune. Por lo tanto, las citocinas afectan a la mayoría de las células del sistema inmunitario, y participan en los procesos autoinmunes.

Además de los linfocitos T y los autoanticuerpos, diversas citocinas juegan un papel importante en la patogenia del LES. Se ha encontrado aumento de varias citocinas en el suero de pacientes con LES, como IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ y TGF- β [44,45]. Sin embargo, la citocina que se ha relacionado en forma más importante con la enfermedad y que actualmente se considera como una de las principales implicadas en la patogénesis de LES, es el IFN tipo I. Estudios recientes sugieren que una vía común en LES y en sus modelos experimentales podría ser una hiperactividad de los interferones tipo I [46-48].

IFN TIPO I EN LES

En la activación inicial de la respuesta inmune adaptativa, las señales positivas dependen de los receptores de antígeno en los linfocitos T y B. Así, para que exista una respuesta inmune productiva, además del ligando para el receptor de antígeno, es indispensable la señalización a través de moléculas coestimuladoras (CD28-CD80 y CD86), inducidas a través de la activación de la inmunidad innata. Los IFN-I, secretados por células de la inmunidad innata, especialmente células dendríticas plasmacitoides, favorecen la expresión de moléculas coestimuladoras por las células presentadoras de antígeno (APC), además de que pueden inducir maduración de células dendríticas a un fenotipo con la capacidad total de activar linfocitos T, por lo cual, cualquier cambio en su expresión y regulación afecta la respuesta inmune y, al menos en teoría, podría favorecer el desarrollo de enfermedades autoinmunes como LES [43].

Desde hace más de 20 años, diversas líneas de evidencia han sugerido fuertemente la participación de los IFN tipo I en la patogenia del LES. En la década de 1980 se descubrió que el suero de pacientes con LES tiene niveles elevados de IFN α , particularmente en aquellos que presentaban actividad de la enfermedad [46-49]. También existe una asociación significativa entre los niveles de IFN α y varios marcadores de la activación inmune, que son considerados de vital importancia para el desarrollo de la enfermedad, como IL-10 circulante, activación de complemento y títulos elevados de anticuerpos contra DNA de doble cadena [50,51].

Esta observación preliminar cobró importancia en 1990, al notar que la administración de IFN α a pacientes con infección viral, ocasionalmente inducía la producción de autoanticuerpos típicos de lupus (~22%), autoinmunidad (~19%) o LES (~0.7%). Sin embargo, en la mayoría de las personas, el IFN-I exógeno o su producción en respuesta a una infección viral no desencadena la enfermedad, por lo que el aumento en IFN-I por sí solo no explica el LES [52,53]. Tales observaciones establecieron la pregunta de si los IFN-I podrían participar en la etiopatogénesis del LES.

Posteriormente, se observó que algunos sueros de pacientes con LES inducen producción de IFN α por células mononucleares (CMN) *in vitro* y algunos estudios sugieren que un factor inductor de IFN α en LES (SLE-IIF) son complejos inmunes, formados por DNA e IgG anti-DNA, que estimulan las CPA a través de su receptor

tipo Toll 9 (TLR9)[54]. Asimismo, los monocitos obtenidos de pacientes con LES poseen una actividad aumentada de presentación de antígenos, lo que sugiere que estas células poseen una maduración hacia un fenotipo de células dendríticas, y que el IFN α presente en el suero de LES podría diferenciar monocitos normales a células dendríticas, contribuyendo así a la respuesta autoinmune [55].

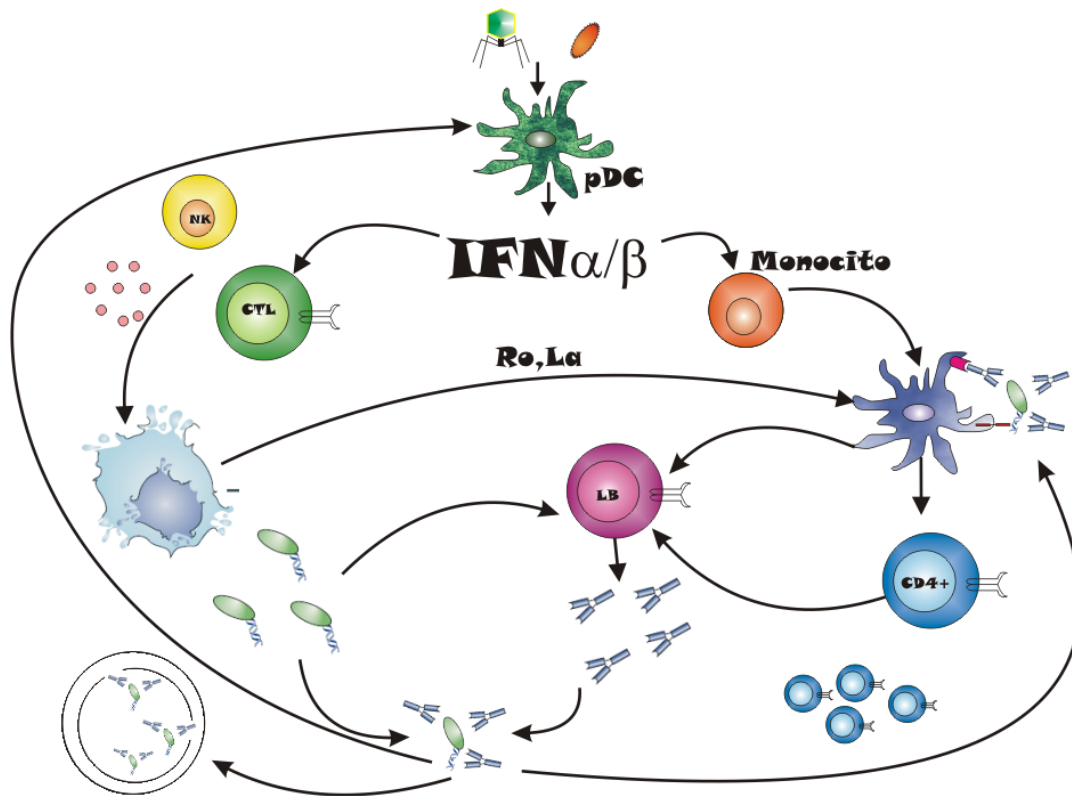


Fig. 1. Posible papel de IFN I en la patogénesis de LES. Ante un estímulo (virus/bacteria), las células dendríticas plasmacitoides producen grandes cantidades de IFN-I, los cuales tienen varios efectos sobre el sistema inmune, como estimular la maduración de los monocitos a células dendríticas, capaces de procesar y presentar antígeno a los linfocitos T CD4+, quienes estimulan la producción de anticuerpos. Por otro lado, los IFN-I estimulan también la activación de CTL y células NK, que producen granzimas, favoreciendo la apoptosis celular, lo cual libera autoantígenos como DNA y proteínas, que pueden ser reconocidos por los autoanticuerpos circulantes formando inmunocomplejos (IC). Los IC pueden unirse a receptores Fc en las células dendríticas, endocitarse y sus antígenos ser presentados a los linfocitos T. De esta manera se activa la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B, que pueden depositarse en el endotelio de vasos de pequeño calibre y causar la inflamación característica del LES.

En modelos de LES en ratones también hay evidencias que apoyan el papel de los IFN-I en su patogenia. En hembras de la cepa New Zealand black (NZB) x New Zealand White (NZW) F₁, el ácido poliinosínico-policitidílico (poli-I:C), que es un RNA sintético de doble cadena, acelera el desarrollo de LES [56]. La eliminación del IFNAR en ratones NZB (otro modelo de LES) previene varias de las alteraciones inmunológicas del LES (incluyendo la producción de autoanticuerpos) y disminuye la maduración de células dendríticas y su actividad estimuladora de linfocitos T, lo cual correlaciona con una disminución de la actividad de la enfermedad [57,58].

En otro modelo experimental de LES deficiente de Fas (ratones MRL_{*lpr,lpr*} y B6_{*lpr,lpr*}), la inyección de poli-I:C acelera la nefropatía, eleva los títulos de autoanticuerpos y otras Ig, y favorece la acumulación de linfocitos activados. Además, la introducción de una mutación en el IFNAR resulta en una disminución dramática del depósito de complejos inmunes en el riñón y reducción de la linfadenopatía [58].

Finalmente, la evidencia más contundente de la participación del IFN α en el LES, proviene de estudios de microarreglos de expresión, en donde Bennett et al.[59] encontraron sobreexpresión de quince genes en CMN de pacientes con LES, catorce de los cuales son inducidos por IFN-I (Fig. 2), además de otros dieciocho genes sobreexpresados en menor medida, doce de los cuales también son regulados por IFN-I. Al menos siete de estos genes (OASL, IFIT1, IFIT4, STAT1, MX1, MX2 e IRF7) han sido encontrados sobreexpresados por otros grupos independientes mediante estudios de microarreglos de expresión [60-62]. Estos resultados indican que los leucocitos de pacientes con LES tienen un patrón de expresión génica característico de la activación por IFN-I (sobreexpresión de genes activados y disminución de genes suprimidos por IFN-I). La expresión de los genes regulados por IFN-I correlaciona con la actividad de la enfermedad [59,60,63]. En conjunto, estas evidencias sugieren que el sistema de IFN-I es determinante en la patogenia del LES, y que probablemente esto se deba a una producción anormal de esta citocina.

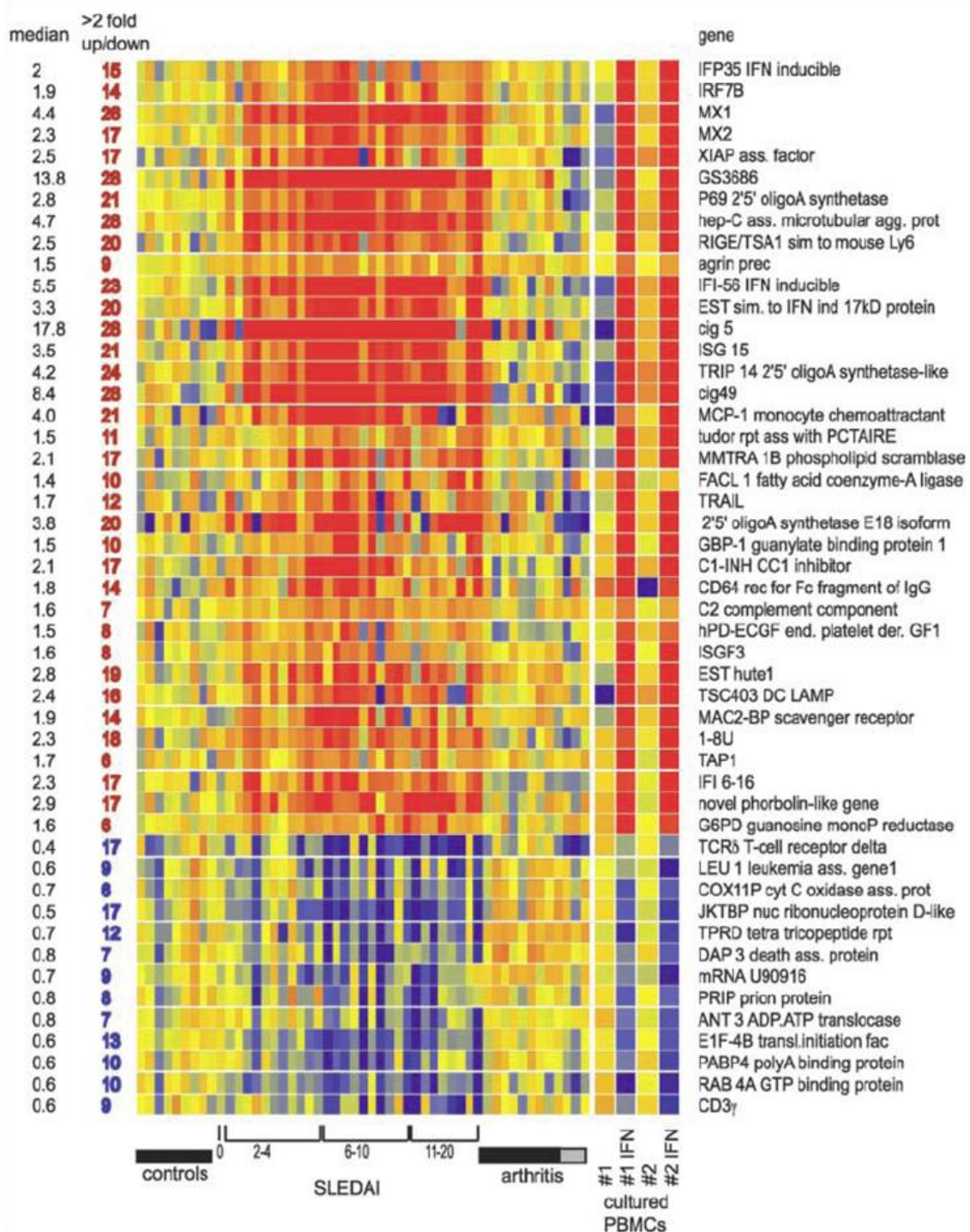


Fig. 2. Estudio de microarreglos de expresión en CMN de LES (Bennet, et al., 2003 [59]) Microarreglos de expresión en LES que muestran un patrón característico de sello de IFN. En rojo se muestran los genes sobreexpresados y en azul los genes inhibidos en pacientes con LES que coinciden con aquellos inducidos o inhibidos (respectivamente) por IFN-I (extrema derecha). Se observa que el sello de IFN aparece claramente en los pacientes con LES, independientemente de su nivel de actividad (escala SLEDAI), pero no en controles sanos ni en pacientes con AR. Los datos de las columnas de la derecha son de CMN de controles sanos cultivadas en presencia o ausencia de IFN α (1000 UI/mL durante 6h).

SISTEMA DE INTERFERONES

Los IFN son una familia de glicoproteínas que tienen en común actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora en respuesta a infecciones virales y otros inductores biológicos. En 1957, Isaac y Lindenmann descubrieron el interferón (IFN), y la caracterizaron como un factor soluble que “interfería” (de ahí el término “interferón”), con los efectos de la infección por virus de la influenza A en membranas corioalantoideas de pollo [64]. A pesar de que inicialmente los IFN fueron descritos como factores antivirales, actualmente se reconocen como citocinas que afectan múltiples procesos biológicos, incluyendo algunos que regulan el crecimiento y proliferación celular, diferenciación, muerte celular programada y modulación de respuestas inmunes [65,66]. Con base en sus propiedades químicas, estructura genética, fuente celular y actividades biológicas, los interferones se clasifican en tres tipos: I, II y III [67].

Los IFN-I incluyen los $IFN\alpha$, β , ω , τ , κ y ϵ . En humanos, los genes de $IFN\alpha$ e $IFN\beta$ son simples, carecen de intrones y todos están localizados en el brazo corto del cromosoma 9[68]. El único IFN-II ($IFN\gamma$) es un factor activador de macrófagos y sus principales productores son los linfocitos T tipo Th1 y células NK[69]. Los IFN-III son los $IFN\lambda_1$, λ_2 y λ_3 o IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente, y también tienen propiedades antivirales. Debido a su descubrimiento relativamente reciente, aún no se tiene una idea clara de su potencial *in vivo*, ni de su mecanismo de acción, además de que su patrón de expresión aún no ha sido elucidado [70]. En este trabajo solamente nos enfocamos en el estudio de IFN-I, por lo que los otros IFN no serán descritos con mayor detalle.

Existen varios tipos de células que pueden producir IFN-I ante un estímulo, incluyendo monocitos, linfocitos B y fibroblastos. Sin embargo, existe un grupo de células poco abundantes con alta capacidad de producir $IFN\alpha$, anteriormente conocidas como células naturales productoras de IFN (NIPC), y hoy denominadas células dendríticas plasmacitoides (pDC). Aún cuando las pDC son mucho menos abundantes que los monocitos, pueden producir mucho más $IFN\alpha$ por célula (1-2 U/célula), comparado con 0.1U/célula por los monocitos. Las pDC están presentes en sangre periférica, médula ósea, nódulos linfáticos, bazo, y timo de individuos sanos [71].

Los IFN-I ejercen sus funciones al unirse a receptores presentes en la superficie celular, lo cual activa a las cinasas Janus (Jak) y a los factores de transcripción

STAT (*signal transducer and activator of transcription*), lo cual finalmente conduce a la expresión de los genes inducidos por IFN-I. Esta vía de transducción de señales se conoce como Jak/STAT.

VÍA DE SEÑALIZACIÓN Jak/STAT

La mayoría de las citocinas tiene una vida media corta y todas pueden actuar a concentraciones muy bajas. La expresión de la mayoría de las citocinas es regulada en forma estricta. En general, las citocinas no se producen en forma constitutiva, ya que para que se produzcan citocinas en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos es necesaria la activación celular. Las acciones de muchas de las citocinas se engloban dentro de un sistema o red funcional, donde el efecto de cada molécula es regulado, positiva o negativamente, por otras moléculas del sistema. Así, la secreción de una citocina puede estar inducida, potenciada o inhibida por otra citocina que, a su vez, puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores.

Al unirse a sus receptores en la superficie celular, las citocinas transducen señales por medio de cinasas de tirosina que conducen a la activación de factores de transcripción, que son traslocados al núcleo celular, donde inducen la transcripción de un gran número de genes blanco, responsables de sus efectos biológicos. Existen dos grandes familias de receptores de citocinas que transducen señales mediante la vía Jak/STAT. La mayoría de las interleucinas lo hace a través de la familia 1, mientras que los interferones transducen señales a través de la familia 2 de receptores de citocinas [72,73].

Los receptores de la familia 2 constan de dos subunidades que carecen de actividad intrínseca de cinasa pero que, como se mencionó, se asocian a cinasas de tirosina de la familia Jak y transducen señales mediante la vía de señalización conocida como Jak/STAT. Esta vía consta de más de 40 péptidos (citocinas) y numerosos receptores [74].

La vía Jak/STAT está conservada a través del reino animal, y ha sido estudiada en varios modelos de organismos, como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el pez cebra *Danio rerio*, además de mamíferos como ratón, rata y humano [75,76].

Las cinasas Janus fueron identificadas a través de comparaciones de secuencias, como una clase única de cinasas de tirosina que tienen un dominio catalítico y uno de pseudocinasa, al que se le atribuye función auto-reguladora (de ahí la referencia al Dios romano Janus, que poseía dos caras). Funcionalmente, se identificó una relación con los factores STAT y los IFN mediante ensayos de tamizaje genético de células somáticas. En mamíferos existen cuatro cinasas Jak (Jak1, 2 y 3 y Tyk2) y siete STAT (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6) [74,77].

Los factores de transcripción STAT son los únicos componentes de la vía de señalización Jak/STAT que están presentes en todos los organismos eucariontes, lo cual deja en claro su importancia. Estos factores se identificaron mediante comparaciones de secuencias y estudios de mutagénesis [78].

En la vía canónica conservada de la señalización por Jak/STAT, conocida como dependiente de Jak, los factores de transcripción STAT se unen a residuos de tirosina de dominios tipo SH2 fosforilados por Jak en los receptores de citocinas. Una vez unidos a su receptor, las proteínas STAT son fosforiladas por las Jak, lo que provoca su disociación del receptor y la formación de homodímeros o heterodímeros que, junto con otros coactivadores y factores de remodelación de la cromatina, se traslocan al núcleo, donde se unen a secuencias consenso del DNA, activando la transcripción de genes blanco, lo cual permite la respuesta celular a cada citocina [79]. Las citocinas, a través de distintas combinaciones de cinasas Jak, activan una o más STAT, que en combinaciones de homodímeros o heterodímeros distintos, dan cierto grado de especificidad a las funciones de cada una de ellas [80]. Finalmente, al cesar el estímulo, las proteínas STAT se desactivan mediante desfosforilación y regresan del núcleo al citoplasma [81-83].

SEÑALIZACIÓN DE LOS IFN TIPO I A TRAVÉS DE Jak/STAT

Todos los IFN-I tienen un receptor único (IFNAR), formado por dos cadenas (IFNAR1 e IFNAR2), perteneciente a la familia de receptores tipo II de citocinas. La unión al IFNAR provoca oligomerización de ambas subunidades del receptor. Al estar en cercanía, las Jak unidas a ambas subunidades del receptor (Tyk2 en IFNAR1 y Jak1 en IFNAR2) se activan mediante trans o autofosforilación. Una vez activadas, las Jak fosforilan sitios específicos dentro del receptor (principalmente en la cadena más larga, IFNAR2) que sirven como puntos de anclaje para los

factores de transcripción STAT1 y STAT2[77], que al estar unidos al complejo, son fosforilados también por las Jak y sufren un cambio de conformación que provoca su separación del complejo y su asociación en dímeros antiparalelos fosforilados unidos a IRF9 (uno de nueve miembros de una familia de reguladores transcripcionales con secuencias homólogas a dominios conservados de unión al DNA).

El complejo trimérico formado por STAT1, STAT2 e IRF9 se denomina ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*). En el caso de IFN α/β , en células sin estimular, STAT2 está pre asociado con IRF9 en el citoplasma, lo que, con la activación, aparentemente facilita la dimerización con STAT1 y acelera la entrada del complejo al núcleo[77]. El complejo ISGF3 ya traslocado al núcleo se une a secuencias conocidas como ISRE (*IFN-stimulated response element*) a través del dominio de unión al DNA de IRF9, activando o reprimiendo la transcripción de diversos genes, que en conjunto se conocen como “sello de IFN” [77,84-87].

SELLO DE IFN

IFN-I puede activar la transcripción de diversos genes a través de varias vías de señalización celular, tales como la vía Jak/STAT y las vías inducidas por TLR. La sello de interferón es el conjunto de genes que son activados o reprimidos a través del estímulo de las células blanco con IFN-I en un tiempo determinado. Dentro de este sello molecular pueden distinguirse genes de citocinas, factores de transcripción y proteínas antivirales, así como genes que codifican proteínas de apoptosis. A continuación se mencionan algunos de los genes más característicos del conjunto que constituye el sello de interferón.

1. GENES ESTIMULADOS POR INTERFERÓN (ISG):

La producción de ISG se estimula a través de la activación de la vía Jak/STAT mediante las moléculas sensoras RIG-I y TLR3 iniciada por la infección viral o bacteriana. Esto conduce a la producción de IFN β , que se secreta y se une a los receptores IFNAR. Como resultado, varios genes estimulados por IFN (ISGs) son inducidos. Varios ISG presentan actividad antiviral, como 2'5' OAS1, PKR y MxA [88]. A continuación, se mencionan las actividades específicas de algunas proteínas inducidas por IFN I.

1.1 2´5´Oligoadenilato sintetasa 1 (OAS1)

2´5´oligoadenilato sintetasa codifica una proteína antiviral que se expresa a niveles bajos constitutivamente como un monómero inactivo en el citoplasma. Después de la activación con RNA viral bicatenario (dsRNA), la enzima se oligomeriza formando un tetrámero que sintetiza 2´5´oligoadenilatos que activan la ribonucleasa L (RNAsa L), que se encuentra constitutivamente expresada en su forma inactiva, lo cual permite que la RNAsa L escinda RNAs celulares (y virales) [89].

1.2 Proteína cinasa R (PKR)

La proteína cinasa R se acumula en el núcleo y el citoplasma como un monómero inactivo, el cual es directamente activado por RNAs virales. Después de la activación, los monómeros de PKR se fosforilan y dimerizan para formar la enzima activa. PKR activada juega un papel importante en la defensa antiviral inhibiendo la traducción a través de la fosforilación del factor eucariótico de inicio de la traducción 2α (EIF2 α)[90].

1.3 MxA

La proteína MxA se acumula en el citoplasma en las membranas intracelulares (como en el retículo endoplásmico) en forma de oligómeros. Después de la infección viral, los monómeros de MxA se liberan y se unen a las nucleocápsides virales o a otros componentes virales, para degradarlos [88].

1.4 Gen estimulado por IFN 15 (ISG15)

Es uno de los genes más abundantemente expresados inducidos por infecciones virales o bacterianas o por el tratamiento con IFN I. ISG15 es la primera proteína similar a ubiquitina identificada, y comparte secuencias y similitudes estructurales con ésta última. De manera similar a la ubiquitina, ISG15 se conjuga a sus blancos celulares a través de una serie de pasos que involucran tres enzimas diferentes; la enzima de activación E1, la enzima de conjugación E2 y la ligasa E3, pero la conjugación con ISG15 no provoca la degradación de sus blancos celulares, sino que puede alterar su localización celular, estructura, estabilidad o actividad [91]. Son blancos importantes de ISG15 proteínas que juegan un papel importante en la respuesta innata antiviral, como PKR, MxA, STAT1 y Jak1 [92].

1.5 Familia de proteínas inducidas por IFN con repetidos de tetratricopéptidos 1 (IFIT)

IFIT1 codifica una proteína antiviral que se sintetiza rápidamente en respuesta a una infección viral, y se une al extremo 5´ terminal del RNA viral, identificado por la presencia de un grupo trifosfato (PPP-RNA). También se ha observado que IFIT1 funciona como un inhibidor de la traducción uniéndose a EIF3 α [93].

2 FACTORES REGULADORES DE IFN (IRF)

La expresión de IFN-I está regulada por una familia de factores de transcripción conocida como factores reguladores de IFN. Se ha descrito un elevado número de miembros de esta familia esenciales en la regulación de la respuesta inmunitaria [94]. De esta gran familia destaca el IRF5, que está involucrado en la inducción de IFN-I y citocinas pro inflamatorias ante una infección viral, después de la activación por la señalización por TLR7 o TLR8. IRF5 se ha identificado como un marcador genético de autoinmunidad. Recientemente se ha descrito un SNP (rs2004640) localizado en la región 5´ del gen IRF5 fuertemente asociado con susceptibilidad a LES [95].

3 CITOCINAS

3.1 Jak1

Juega un papel importante en la respuesta inmune pro-inflamatoria al fosforilar los receptores de IFNAR, desencadenando una respuesta de IFN-I. Se encuentra constitutivamente unido a IFNAR2 y promueve la fosforilación de los dímeros de STAT1 y STAT2 [95].

4 APOPTOSIS

4.1 Ligando relacionado a TNF inductor de apoptosis (TRAIL)

Codifica una proteína que contiene el dominio funcional DD (Death Domain), capaz de inducir apoptosis, a través de la proteína adaptadora FADD (Fas associated Death-domain) que funciona como un puente molecular para la caspasa 8, la cual activa la cascada de muerte celular [96].

REGULACIÓN NEGATIVA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Jak/STAT

La señalización por citocinas es regulada negativamente por tres sistemas. El más importante y específico es el de las proteínas SOCS (*suppressors of cytokine signaling*). La expresión de las proteínas SOCS es inducida por las mismas citocinas inhibidas por ellas en un sistema de retroalimentación negativa [97]. El segundo es el correspondiente a la PTPasa Shp1 y posiblemente otras PTPasas, que desfosforilan las STAT y a los receptores de IFN[98,99]. Finalmente, en el núcleo existen inhibidores proteínicos de las STAT activadas (PIAS)[97,98]. En este trabajo nos enfocamos en las proteínas SOCS, específicamente SOCS1 por ser el principal reglador de la vía, así que lo que los mecanismos de acción de otros reguladores no se describen más fondo.

FAMILIA SOCS

SOCS es el nombre más común que se ha utilizado para designar a un grupo de proteínas que participan en la regulación negativa de la señalización por citocinas y de otras vías de señalización, a través de diversos mecanismos. En mamíferos, existen ocho miembros de este grupo; SOCS1-SOCS7 y CIS (por sus siglas en inglés "*cytokine inducible SH2 protein*").

Los ocho miembros de la familia SOCS poseen un dominio central de tipo SH2, un dominio N-terminal de longitud variable y un dominio C-terminal de 40 aminoácidos de longitud, la caja SOCS. Además sus dominios SH2 se unen a fosfotirosinas presentes en los receptores de citocinas (SOCS2, SOCS3 y CIS) o a las Jak (SOCS1) suprimen la señalización por citocinas, ya sea al unirse a las Jak, impidiendo su fosforilación y activación; compitiendo con la unión las de las STAT a los receptores fosforilados y/o marcando proteínas de la vía de activación para su degradación por el proteasoma[100-104].

Los transcritos que codifican SOCS1, SOCS2, SOCS3 y CIS generalmente se encuentran en niveles muy bajos en las células, pero se inducen en 15-30 minutos por una amplia variedad de citocinas, hormonas y factores de crecimiento. Hasta la fecha, existe poca evidencia de que SOCS4, SOCS5, SOCS6 y SOCS7 sean inducidos por citocinas.

SOCS1

CIS, SOCS1 y SOCS3 inhiben la señalización por eritropoyetina (EPO), hormona de crecimiento, prolactina, IL-2 e IL-3 [105-108]. SOCS1 (también conocido como SSI-1 y JAB por sus siglas en inglés “*STAT Induced/STAT Inhibitor*” y Jak Binding Protein”) es el principal regulador de la vía Jak/STAT dependiente de IFN-I, IFN γ , IL-2, IL-3, eritropoyetina (EPO), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) y leptina [107,108]. SOCS1 fue caracterizado simultáneamente por tres grupos. Starr y colaboradores clonaron el DNA complementario que codifica la proteína SOCS1 basados en su capacidad de suprimir la diferenciación de células de leucemia mieloide de ratón (M1) a macrófagos en respuesta a IL-6. La expresión de SOCS1 inhibía la fosforilación del receptor de IL-6 y la activación de STAT. Los mismos autores clonaron SOCS2 y SOCS3 y observaron que su transcripción aumentaba rápidamente en respuesta a IL-6, tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que sugirió que estas proteínas pueden actuar como retroalimentación negativa para regular la transducción de señales por citocinas[109].

Por otro lado, los grupos de Endo T.A. y Yoshimura, mediante un sistema de doble híbrido, clonaron la misma proteína, a la cual llamaron JAB (Jak binding protein) y la describieron como una molécula con un dominio SH2 que interacciona con el dominio JH1 de Jak2. Los autores refieren que la interacción de JAB con Jak1, Jak2 o Jak3, reduce marcadamente su actividad de cinasa de tirosina y previene la fosforilación del residuo tirosina y la posterior activación de STAT. Ellos concluyeron que la proteína podría funcionar como un inhibidor negativo de la vía de señalización de Jak/STAT[101].

Finalmente, Naka T. y colaboradores clonaron y caracterizaron un inhibidor de la activación de STAT, al cual denominaron SSI-1 (*STAT-induced STAT inhibitor-1*). El mRNA de esta proteína se inducía por IL-4 y 6, el factor inhibidor de leucemias (LIF) y el G-CSF. Los autores demostraron que el estímulo por IL-4 o IL-6 en células M1 inducía la expresión de SSI-1, que es antagonizada por al transfectar una mutante dominante negativa de STAT3, indicando que el gen SSI-1 es blanco de STAT3. Los autores también detectaron asociación de SSI-1 con las Jak2 y Tyk2 [104].

La proteína SOCS1 tiene tres dominios funcionales: KIR (*kinase inhibitory region*), el subdominio SH2 extendido, y el dominio SH2. A pesar de que se desconoce la función del dominio C-terminal, se dedujo que no es necesario para inhibir la señalización por Jak. Tanto el dominio SH2 como el subdominio extendido SH2 son necesarios y suficientes para la unión a los residuos tirosina de las Jak [110]. La región N-terminal de SOCS1 denominada KIR también contribuye a la unión de alta afinidad al dominio de cinasa de tirosina de las Jak y es esencial para la inhibición de la actividad de cinasa de Jak [111,112].

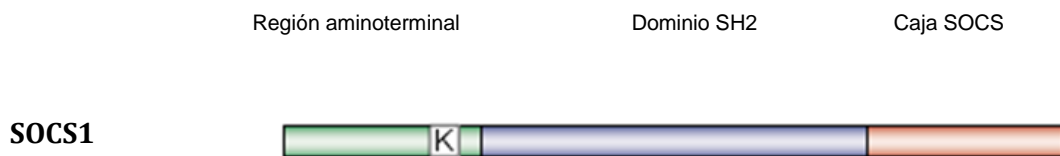


Fig.3. Estructura de SOCS1. SOCS1 consta de tres dominios proteínicos: el dominio amino-terminal (KIR), dominio tipo SH2 y la caja SOCS.

Se sabe que la proteólisis activada por ubiquitinación juega un papel importante en varios procesos biológicos, tales como transcripción y transducción de señales. Recientemente, varios estudios han sugerido que los miembros de la familia SOCS podrían regular la señalización de varias citocinas, fungiendo como adaptadores del complejo de ligasas de ubiquitina tipo E3. Los grupos de Kamura y Zhang determinaron que la caja SOCS es capaz de formar un complejo con las elonginas B y C, que son ligasas E3 de ubiquitina asociadas a las proteínas culina-5 y Rbx-1, lo cual llevaría a la degradación de las proteínas asociadas a SOCS1 por el proteasoma [110,113].

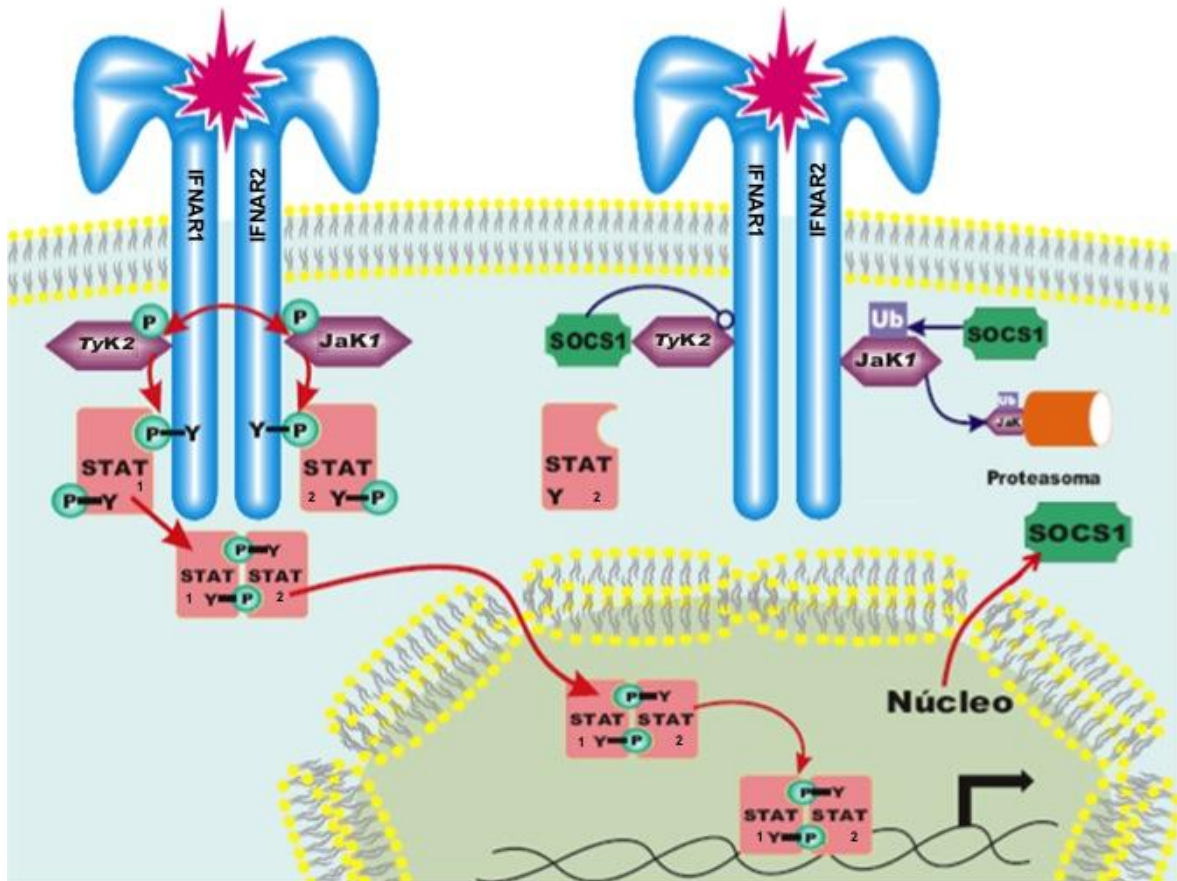


Fig.4. Regulación negativa de la vía Jak/STAT inducida por IFN-I, por la proteína SOCS1. En condiciones de activación, una citocina se une a su receptor, oligomerizando sus subunidades y permitiendo así unión y activación de las cinasas Jak. Jak1 y Tyk2 se autofosforilan y a continuación fosforilan tirosinas en los dominios citoplásmicos de los receptores, que son los sitios de unión para miembros de la familia de los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT1 y STAT2), que a su vez son fosforiladas por las Jak, formando heterodímeros. SOCS1 actúa inhibiendo diversos puntos de la vía para reprimir la transducción de señales. SOCS1 impide la activación de algunas Jak, al unirse a ellas en los residuos de tirosina cuya fosforilación es necesaria para la activación de estas cinasas. Además, puede marcar estos mismos componentes de la vía para su degradación proteasómica.

Las acciones de IFN-I arriba descritas podrían contribuir a un proceso autoinmune en varias maneras.

El LES es una enfermedad autoinmune caracterizada por lo que parece ser un aumento en la sensibilidad a los IFN-I, ya que los pacientes tienen la vía de IFN-I constitutivamente activada, pero los niveles de esta citocina presentes en su suero no siempre correlacionan con la actividad de la enfermedad [45-48]. Además, se han detectado casos en que la administración terapéutica de IFN α conduce a LES sólo en ciertos individuos [52, 53]. Esto nos llevó a considerar la probabilidad de que el defecto en LES con respecto a IFN-I no es una activación persistente y

aumentada de esta citocina debido a sus altos niveles presentes en el suero de los pacientes, sino una disminución en el umbral de respuesta a niveles normales de IFN-I, o bien, a un defecto en la regulación de la señalización por este tipo de IFN.

En este estudio examinamos los niveles basales de fosforilación de la vía de señalización de IFNAR en muestras de sangre periférica de pacientes con LES activo e inactivo. Además, decidimos analizar los niveles de expresión (mRNA y proteína) de SOCS1, debido a que es el inhibidor mejor caracterizado de la vía de señalización inducida por IFN-I [41] y además, porque su deficiencia parcial se ha asociado con un síndrome semejante al LES (SLE-like síndrome). [114-117].

Hipótesis

En LES, existe un aumento en la sensibilidad de IFNAR, o una falla en la regulación de la vía inducida por IFN-I, que pueden estar asociados al patrón génico característico de IFN-I (sello de IFN) asociado a la enfermedad.

Objetivos generales

Investigar el estado de activación del IFNAR y de otras proteínas de la vía de señalización por IFN-I en CMN de pacientes con LES y examinar los cambios del mismo receptor en respuesta a IFN-I *in vitro*.

Estudiar la expresión transcripcional del principal regulador de la vía de IFN-I, SOCS1 y sus interacciones moleculares en células mononucleares de pacientes con LES.

Objetivos particulares

- ② Detectar y comparar la expresión de las dos cadenas de IFNAR y su asociación con las proteínas de la vía de señalización por IFN-I en CMN de pacientes con LES y controles sanos
- ② Detectar y comparar la expresión y fosforilación de STAT2 y Jak1 en CMN de pacientes con LES e individuos sanos
- ② Comparar la expresión de la proteína SOCS1 en CMN de pacientes con LES e individuos sanos
- ② Cuantificar los niveles de transcripción de SOCS1 en CMN de pacientes con LES e individuos sanos
- ② Examinar el efecto del IFN-I en cada uno de los parámetros descritos en los objetivos particulares aquí mencionados.

Materiales y métodos

PACIENTES

Se colectaron muestras de sangre periférica (50 mL en heparina y 3mL sin anticoagulante para el suero) de pacientes femeninos que satisfacían los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR) para LES (en ausencia de otras infecciones o enfermedades crónico degenerativas) y de controles sanos. El índice de actividad de la enfermedad se determinó mediante la escala SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Activity Index*) (Apéndice I). El índice SLEDAI es una escala global desarrollada para evaluar la actividad de la enfermedad. Consta de una lista de 24 síntomas, 16 clínicos y 8 medidas de laboratorio, los cuales se marcan basados en la presencia o ausencia de estas manifestaciones en los 10 días previos a la prueba. A cada síntoma se le asigna un valor, por ejemplo, a los síntomas orgánicos se les asigna 4, pero a neurológicos se les asigna 8. Finalmente, las manifestaciones presentes se suman en un resultado final, que puede ir de 0 a 105. Los resultados sobre 20 son extremadamente raros. Un SLEDAI de 6 frecuentemente se relaciona con una enfermedad activa que requiere terapia[118].

Los pacientes con LES en este estudio se consideraron como: inactivos (SLEDAI 0), medianamente activos (SLEDAI 1-4) y muy activos (SLEDAI >7). Todos los pacientes, exceptuando dos, recibían ≤ 10 mg de prednisona o su equivalente/día y ningún fármaco citotóxico, excepto uno que recibía azatioprina. Los pacientes con falla renal o hepática y aquellos con alguna otra afección inflamatoria, incluyendo enfermedades infecciosas agudas o crónicas, o cualquier tipo de cáncer fueron excluidos del estudio. Se examinaron treinta y un pacientes para mRNA y un número variable de pacientes en las demás categorías experimentales. El protocolo fue aprobado por las comisiones de investigación y de ética del IMSS y el Comité de Investigación en Humanos, ICMNNSZ y los sujetos fueron informados de los contenidos del protocolo y se les pidió que firmaran un consentimiento informado para participar en el estudio. Todo el protocolo fue llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki WMA.

ESTÍMULOS IN VITRO CON IFN TIPO I

Las células mononucleares se aislaron en gradiente de Ficoll-Ditrizoato de sodio (Lymphoprep, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega) y se dividieron en dos fracciones. La primera se incubó en medio RPMI (GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado con L-glutamina (2mM), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100µg/mL) y 10% de suero fetal bovino (HyClone, Salt Lake City, Utah) en presencia o ausencia de 50U/mL IFNβ humano recombinante (Emaxem Probiomed, México, D.F.) por 30min, 1h, 4h (para analizar la expresión de STAT2, Jak1 and IFNAR) y 1h, 4h and 6h (para analizar la expresión de SOCS1). La segunda fracción se incubó en medio RPMI o en medio RPMI con 50U/mL de IFNβ por 30 min para la extracción de RNA.

DETERMINACIÓN DE IFN I EN SUERO

Los niveles séricos de IFNα fueron determinados mediante un kit VeriKine Human IFNα ELISA Kit, product No. 41105, Pestka Biomedical Laboratories Inc., Piscataway, New Jersey, el cual detecta 14 de los 15 subtipos de IFNα conocidos hasta ahora.

MUESTRAS DE PLASMA Y ESTÍMULO DE CMN

Para determinar si en el plasma de los pacientes con LES había actividad de IFN-I no detectable por el método de ELISA, se realizó una prueba con plasmas de controles sanos o de pacientes con LES y CMN de individuos sanos y a continuación se determinó la expresión de genes inducibles por IFN-I. Se centrifugaron 10 mL de sangre heparinizada y se colectó el plasma, el cual se conservó a -70°C hasta el momento de su uso. Las CMN de los controles sanos se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo plano una densidad de 10⁵/pozo en 100µl) en presencia de medio RPMI, 50U/mL de IFNβ, o plasma de controles sanos o plasma de pacientes con LES (50%v/v). Después de una hora de estímulo, se extrajo el RNA de cada fracción de CMN usando la técnica de Chomczynski et al.[119], mediante el reactivo Trizol^{MR}. El RNA fue cuantificado en un NanoDrop^{MR} y se comprobó su integridad en un gel de agarosa 1.2% no desnaturizante. Se amplificaron 15ng de RNA total en 10µL de reacción de RT-PCR cuantitativa en tiempo real con 90mM de iniciadores sentido y anti-sentido y 25µL de una mezcla de reacción de 2x SYBR green con ROX, pigmento inerte usado como referencia pasiva para normalizar las diferencias entre los pozos de las reacciones debidas a

artefactos como errores de pipeteo. (*InVitrogen*). Las secuencias de los iniciadores de genes inducibles por IFN-I fueron: EIF2 α , 5' - TTG CTT CAA AAA CAT TCT TAC ATT TT-3' (sentido) y 5' - GGG CAA CAG AGC GAG ACT-3' (antisentido); 2'5'OAS, 5' - GAG GGG GTG GAG TTC GAT-3' (sentido) and 5' - GGT TAG GTT TAT AGC TGC CAG TCA-3' (antisentido); MxA 5' - GAT GTC CCG GAT CTG ACT CT-3'(sentido) y 5' - TGG ATG TAC TTC TTG ATG AGT GTC T-3' (antisentido). El instrumento para tiempo real se programó como sigue: 50°C por 3 minutos; 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de: 95°C por 15 segundos; 60°C por 30 segundos; 40°C por 1 minuto.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Con el objetivo de analizar los niveles reales de expresión de las proteínas, así como su cinética de expresión e inducción ante un estímulo con IFN-I, las CMN de la fracción 1 se lisaron con buffer de lisis celular (TRIS-HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM, Igepal CA-630 1%, mezcla de inhibidores de proteasas (*Calbiochem*). Las proteínas se obtuvieron mediante centrifugación por 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C y se cuantificaron con el reactivo de Bradford. Se cargaron 20mg de lisado proteínico total en un gel de acrilamida al 12% y se separaron por electroforesis SDS-PAGE durante aproximadamente 2h a 90mV. Para determinar el Mr de las proteínas se incluyeron marcadores de peso molecular pre-teñidos (*Bio-Rad*) en el gel.

A continuación, los geles se transfirieron por 1h a 20V a membranas de PVDF (*Bio-Rad*), las cuales se bloquearon por 30 minutos a temperatura ambiente con leche al 5%/PBS/0.05%Tween 20. Las membranas se incubaron durante toda la noche con anticuerpos contra SOCS1 (1mg/mL de cabra, policlonal anti-SOCS1, *ABCAM*), STAT2 (1mg/mL de conejo, policlonal anti-STAT2, *Santa Cruz Biotechnology*), STAT2 fosforilado (0.5mg/mL de conejo policlonal anti-pSTAT2, *Upstate Biotechnology*), Jak1 (1mg/mL de conejo, policlonal anti-Jak1, *Santa Cruz*), Jak1 fosforilado (0.5mg/mL de conejo policlonal anti-pJak1 *ABCAM*), IFNAR1 (1mg/mL de ratón anti-IFNAR1, *Santa Cruz*) y IFNAR2 (1mg/mL de conejo policlonal anti-IFNAR2, *Santa Cruz*) a 4°C. Los blots se incubaron durante 1h con una dilución de 1:10,000 de anticuerpos secundarios IgG conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) (*Jackson Immunoresearch Laboratories*), para posteriormente detectar la señal mediante una reacción de quimioluminiscencia (*Amersham ECL*

Western Blotting Systems, GE Healthcare), la cual fue detectada y registrada por un escáner de geles *STORM (GE Healthcare , antes Molecular Dynamics)*.

Con el objetivo de ajustar las posibles diferencias en la cantidad total de proteína cargada en el gel, las membranas se reblotearon con una solución de glicina 0.1M, pH 2.5, 0.5% SDS, para después ser incubadas con 1mg/mL de anticuerpo de cabra anti-GAPDH (*Santa Cruz*). Los blots fueron revelados de la manera descrita anteriormente. Los niveles de expresión de todas las proteínas analizadas se normalizaron contra los valores de GAPDH y se examinaron por densitometría. Las bandas se midieron mediante el software *Kodak 1D Image Analysis Windows* versión 3.5, utilizando la opción de corrección de fondo. Para calcular las relaciones proteína/GAPDH problema se utilizaron las intensidades netas en unidades *Kodak light*.

COINMUNOPRECIPITACIÓN

Una fracción de las células incubadas en medio o con 50U/mL de IFN β por tiempos variables, se cosechó, se lavó, las células se lisaron y se cuantificaron las proteínas en el lisado. Se incubaron 50 μ g de proteínas totales durante toda la noche con 1mg/mL de anti-IFNAR1 y anti-IFNAR2 (individualmente o mezclados) a 4°C. Los lisados se incubaron durante toda la noche con 100mL de proteína G-agarosa (IFNAR2) o proteína A-agarosa (IFNRA1). Las proteínas se colectaron mediante centrifugación a 12,000 rpm/1min/4°C y se lavaron tres veces con buffer de lavado que contiene 0.1% Igepal, después de lo cual se re suspendieron en búffer de carga Laemmli 5x. Las muestras se calentaron a 95°C por 5 min y se eluyeron por centrifugación a 12,000 rpm/5 min. Estas proteínas se corrieron en SDS-PAGE al 12%, se transfirieron a membranas de PVDF y se revelaron con anticuerpos contra SOCS1, STAT2, Jak1 y Tyk2 (1mg/mL conejo, policlonal anti-Tyk2) como se indica anteriormente. El control de carga para estos experimentos como control de carga fue la cadena pesada de los anticuerpos utilizados para la inmunoprecipitación.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y RT-PCR TIEMPO REAL

Se obtuvo RNA total de las células de la fracción 2 mediante la extracción por isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo con el reactivo Trizol (InVitrogen). La concentración del RNA se determinó por absorbancia a 260nm, y su integridad se verificó corriéndolo en geles no desnaturizantes de agarosa 1.2%. El RNA total se

transcribió para sintetizar cDNA uncatenario utilizando un kit de Amersham. El ensayo de RT-PCR tiempo real se llevó a cabo en el termociclador LightCycler 7900 RT Real Time (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados fueron: SOCS1-FAM 5´[GCCAGCGGAACTGCTTTT]3´ sentido, y 5´[AGTGACGCGGATGCT]3´ antisentido (Cat. No. 4332078, Applied Biosystems), MxA-FAM (Cat. No. 4332078, Applied Biosystems). La variabilidad en las cantidades iniciales de cDNA se normalizó al control interno GAPDH-VIC (Cat. No. 4326317E Applied Biosystems). Cada cDNA problema (SOCS1 y MXA) se amplificó por cuadruplicado en placas de 384 pozos, en ensayo multiplex incluyendo a GAPDH en pozos individuales. Los cálculos se llevaron a cabo de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Applied Biosystems User Bulletin No. 2, P/N 4303859). Para las gráficas, los valores de los controles se consideraron como =1, mientras el valor de la expresión génica de los pacientes corresponde a los resultados obtenidos de los cálculos.

ANÁLISIS DE miRNA155

A las muestras de RNA total se les realizó amplificación y cuantificación de miRNA 155 con el método de RT-PCR en tiempo real con el equipo ABI 7900HT Real time PCR System (Applied Biosystems, Llc, Foster City, CA USA) y el software DataAssist (Applied Biosystems, Llc, Foster City, CA USA). Dicho proceso se realizó bajo las siguientes condiciones de termociclado: 50°C por dos minutos y 95°C por 15 seg (activación), seguidos por 40 ciclos de 95°C por un minuto (desnaturalización) y 60°C por dos minutos (alineamiento y extensión). El programa nos permite normalizar la fluorescencia detectada durante el proceso de amplificación, respecto a un control endógeno (GAPDH) y reportar la cantidad de miRNAs en la muestra problema con respecto a un estándar. Agradecemos al Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes del INMEGEN por la ayuda proporcionada en esta parte del experimento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student para muestras no pareadas (aunque los datos también se analizaron para muestras pareadas) con un intervalo de confianza del 95% considerado como significativo y definido como $p < 0.05$. Para identificar correlaciones entre los diferentes parámetros se calcularon regresiones lineales simples y correlaciones de Pearson con intervalo de confianza del 95%.

TABLA I. PACIENTES CON LES

Pac. No.	Edad	SLEDAI	Años/LES	C3	C3	PDN ¹	Otro
1*	33	0	10	Normal	Normal	0	NA
2*	41	0	23	Normal	Normal	0	NA
3*	32	0	3	Bajo	Bajo	0	NA
4*	30	0	15	Normal	Normal	0	NA
5*	32	0	9	Normal	Bajo	0	NA
6	23	0	7	Normal	Bajo	0	NA
7	28	0	0.3	Normal	Normal	0	Nil
8	42	0	1	Normal	Normal	5	Nil
9	27	0	12	Bajo	Normal	5	Nil
10	22	0	7	ND	ND	5	HCQ 150
11	48	1	1	Normal	Normal	5	Nil
12	36	1	10	Bajo	Bajo	7.5	Nil
13	36	1	15	Normal	Normal	10	Nil
14	20	2	2	Normal	Normal	2.5	Nil
15	21	2	5	Normal	Bajo	5	Nil
16	20	2	7	Bajo	Bajo	10	Nil
17	15	3	1	Bajo	Bajo	5	Nil
18	22	3	4	Normal	Bajo	7.5	HCQ 150
19	24	3	3	Bajo	Bajo	0	HCQ 200
20	23	3	11	Bajo	Bajo	7.5	HCQ 150
21	19	3	1	Normal	Bajo	7.5	HCQ 150
22	28	4	1	Bajo	Bajo	5	Nil
23	40	4	0.6	Bajo	Bajo	7.5	HCQ 400
24	49	7	6	Bajo	Normal	0	AZA 50; HCQ 300
25	44♂	8	5	Bajo	Normal	5	Nil
26	35	8	1	Bajo	Normal	0	HCQ 300
27	20	10	3	Bajo	Bajo	2.5	CHQ 100
28	34	14	7	Bajo	Bajo	10	CHQ 200
29	25	15	15	Bajo	Bajo	5	CHQ 200
30	50	15	3	Bajo	Bajo	7.5	Nil
31	35	15	2	Bajo	Normal	50	CHQ 200
32	20	16	<1	Bajo	Bajo	7.5	CHQ 200
33	17	17	<1	Bajo	Bajo	0	Nil

*Pacientes en remisión

¹ mg por día de prednisona

Tabla I. Características de los pacientes incluidos en el estudio. AZA = Azatioprina; HCQ = Hidroxicloroquina; CHQ = Cloroquina; PDN = Prednisona.

Resultados

Fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2 en CMN de pacientes con LES.

El primer objetivo fue analizar el estado de activación del IFNAR en pacientes con LES, en condiciones basales, como posible explicación para el sello de IFN asociado a LES. Inicialmente se examinó el estado de las proteínas de transducción de señales asociadas a IFNAR en pacientes con LES, clasificados de acuerdo a la actividad de la enfermedad mediante la escala SLEDAI, dividiendo en dos grupos: inactivos (SLEDAI 0) y activos (SLEDAI >0). Dado que las moléculas de señalización asociadas a IFNAR1 (STAT1 y Tyk2) también se activan a través del receptor a IFN γ (IFNGR), y la muestra sanguínea de los pacientes era un factor limitante para el estudio, consideramos que sería preferible analizar sólo las proteínas que se asocian a IFNAR2: Jak1 y STAT2, podía proveer información certera acerca de la señalización inducida por IFN-I, sin influencia de los efectos del IFN γ .

Las CMN de pacientes con LES y de controles sanos se cultivaron en ausencia o en presencia de 50U/mL IFN β de 0 a 4h para evaluar el estado de fosforilación de Jak1 y STAT2. Las células se lisaron, se aislaron las proteínas, se corrieron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF, mismas que después se revelaron con anticuerpos contra las proteínas especificadas.

Las figuras 5A, 5C, 6, 7A, 7C y 8 muestran los resultados del western blot con anti-Jak1 y anti-STAT2 de lisados de CMN de controles sanos o pacientes con LES. La expresión basal de Jak1 y STAT2 se encontró ligera, pero significativamente, más alta en pacientes con LES que en los controles sanos.

En células de pacientes con LES, la vía de señalización inducida por IFN-I se encontraba activada *in vivo*, ya que en las células no estimuladas, las proteínas de señalización Jak1 y STAT2 estaban fosforiladas constitutivamente, ambas $p < 0.0001$ LES total/controles (Figs. 5B, 5C y 6; y 7B, 7C y 8, respectivamente). En ausencia de IFN β exógeno, no se encontró fosforilación de Jak1 y STAT2 en CMN de controles sanos.

La fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2 en CMN de LES sugiere dos posibilidades no excluyentes; que en esta enfermedad la actividad de cinasa Jak1 está aumentada o que su regulación está disminuida. Por lo tanto, analizamos la

fosforilación de Jak1 y STAT2 mediante la técnica de western blot cultivando las CMN en presencia de 50 U/ml IFN β (Figs. 5B, 5C y 6, y 7B, 7C y 8). Como se observa, IFN β indujo fosforilación de Jak1 y STAT2 tanto en controles sanos como en pacientes con LES. En células de pacientes con LES, el aumento en la fosforilación sobre el basal fue sólo marginal, mientras que en controles sanos, una hora después de la adición de IFN β , la fosforilación de Jak1 y STAT2 alcanzó niveles similares a los de las CMN de LES.

En controles sanos, la fosforilación de Jak1 y STAT2 comenzó a descender 4h después del estímulo exógeno con IFN-I. En contraste, en CMN de LES, la fosforilación de Jak1 y STAT2 persistió por más tiempo que en CMN de controles sanos, siendo esta diferencia mucho más clara entre controles y pacientes con LES activo (para p-Jak1, 4h después del estímulo, $p=0.0212$; para p-STAT2, 4h después del estímulo, $p=0.0339$). Por lo tanto, la fosforilación de Jak1 y STAT2 en los pacientes con LES no parece deberse a un potencial de señalización elevado a través de IFNAR, sino más bien a una regulación alterada del receptor. Estos hallazgos sugieren que la regulación alterada de IFNAR puede ser un factor de riesgo para el desarrollo del LES.

La diferencia entre los valores de expresión de p-Jak1 y p-STAT2 entre controles sanos y pacientes con LES en ausencia de un estímulo exógeno de IFN β fue estadísticamente significativa, y de manera importante, la fosforilación se encontró presente también en los pacientes con LES inactivo (para p-Jak1, controles vs. LES activo $p<0.0001$ y controles vs. LES inactivo $p=0.0006$; para p-STAT2, controles vs LES activo y controles vs LES inactivo $p<0.0001$). Las diferencias entre LES activo e inactivo, a pesar de ser menores, también fueron estadísticamente significativas para p-Jak1 ($p=0.0477$).

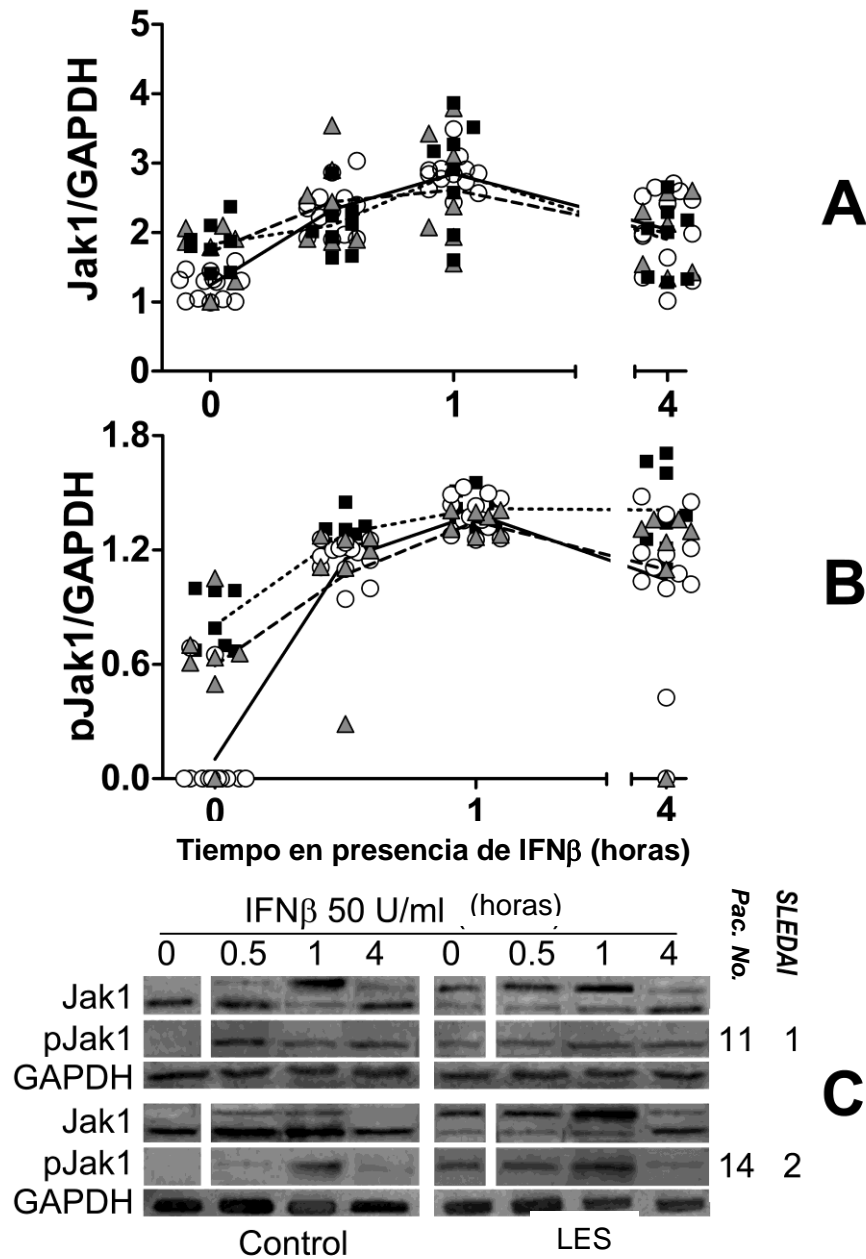


Fig. 5. Fosforilación constitutiva de Jak1 en CMN de pacientes con LES. A y B, valores densitométricos de Jak1/GAPDH y p-Jak1/GAPDH, respectivamente, de extractos proteínicos de CMN de pacientes con LES (n=15, cuadros y triángulos) o el mismo número de controles sanos (círculos) antes (tiempo 0) y a diferentes tiempos de cultivo después de la adición de 50U/mL de IFN β humano recombinante. LES inactivo (triángulos) incluye pacientes con SLEDAI 0 y LES activo (cuadros) incluye pacientes con SLEDAI ≥ 1 . C. Muestras de Western blot de Jak1 de 2 pacientes (derecha) con sus respectivas mediciones de SLEDAI y controles sanos (izquierda).

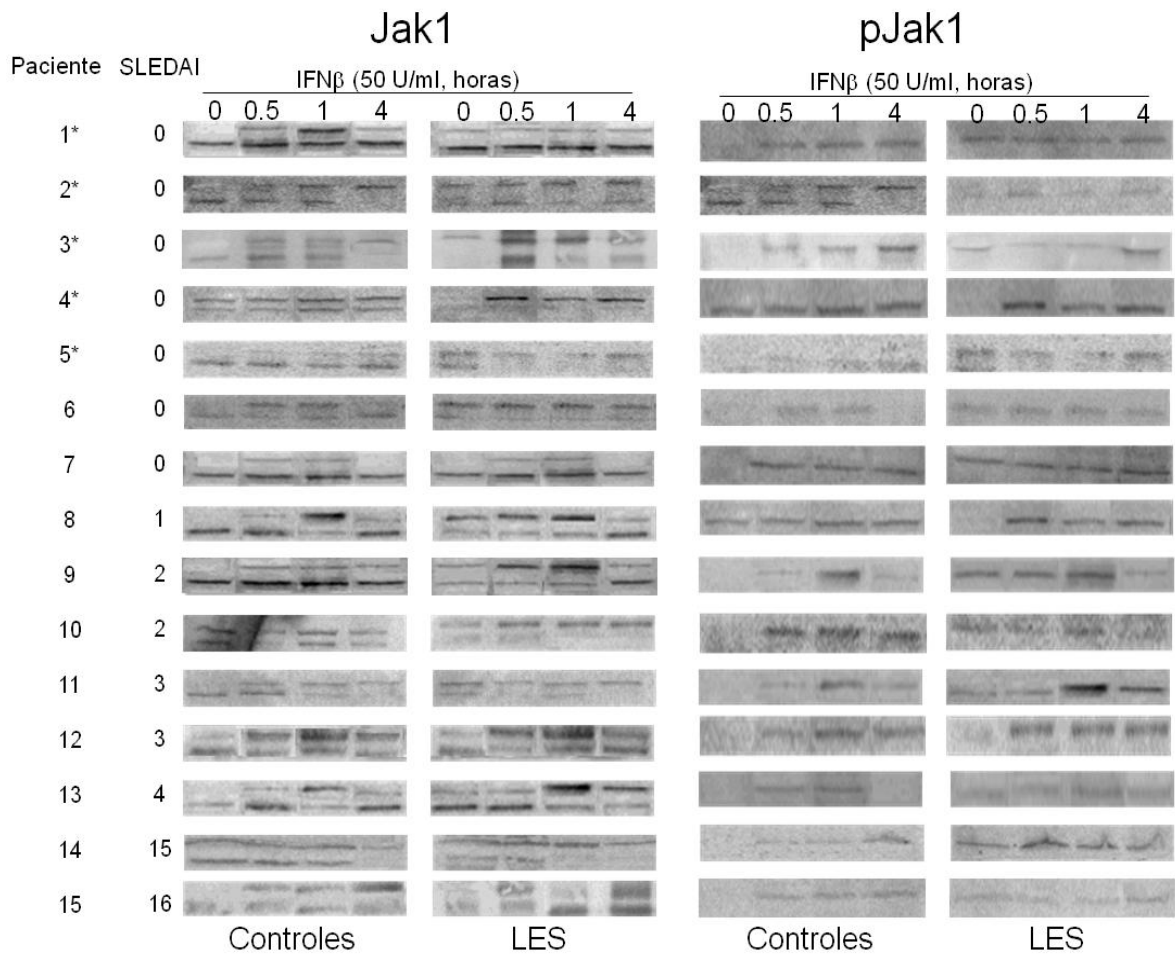


Fig. 6. Fosforilación constitutiva de Jak1 en LES. Se muestran los Western Blots para Jak1 y p-Jak1 de los 15 pacientes con LES analizados, clasificados de acuerdo a la escala SLEDAI, comparándolos con controles sanos, a los tiempos de estímulo con IFN β indicados. Los pacientes con asterisco se encuentran en remisión de la enfermedad.

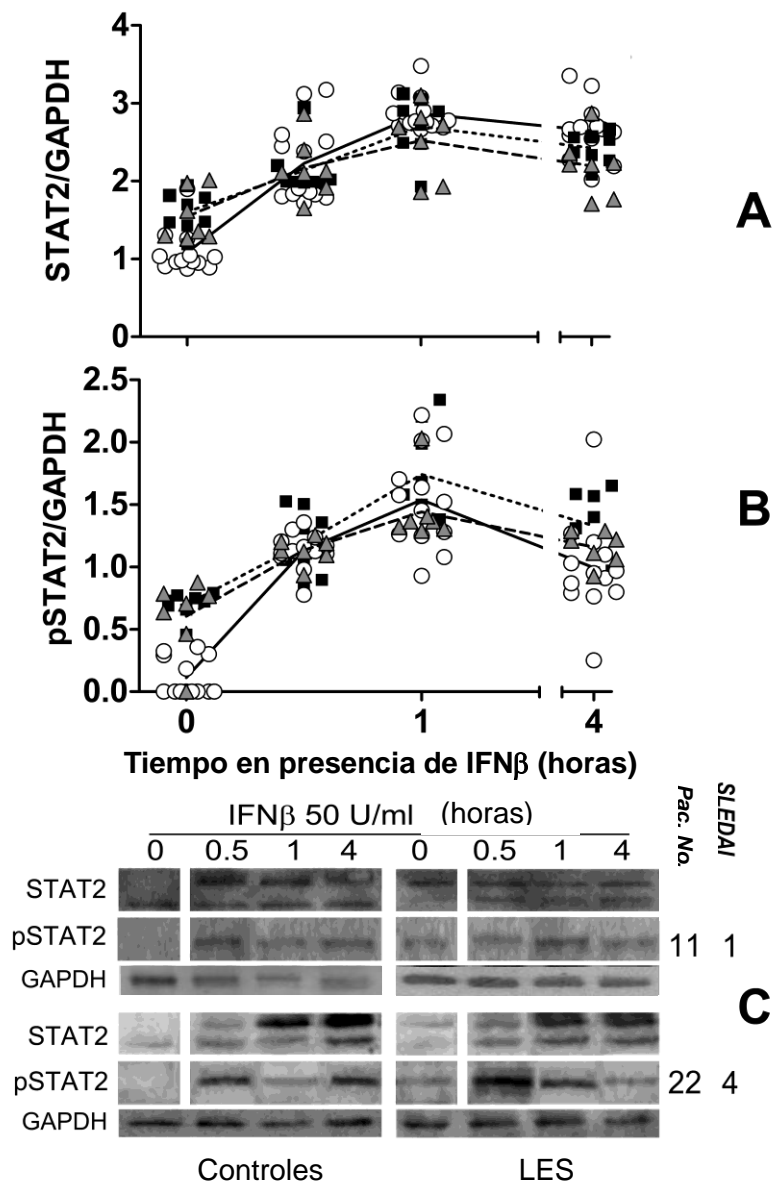


Fig. 7. Fosforilación constitutiva de STAT2 en CMN de pacientes con LES. A y B, valores densitométricos de STAT2/GAPDH y p-STAT2/GAPDH, respectivamente, de extractos proteínicos de CMN de pacientes con LES ($n=15$, cuadros y triángulos) o el mismo número de controles sanos (círculos) antes (tiempo 0) y a diferentes tiempos de cultivo después de la adición de 50U/mL de IFN β humano recombinante. LES inactivo (triángulos) incluye pacientes con SLEDAI 0 y LES activo (cuadros) incluye pacientes con SLEDAI ≥ 1 . C. Muestras de western blot de STAT2 de 2 pacientes (derecha) con sus respectivas mediciones de SLEDAI y controles sanos (izquierda).

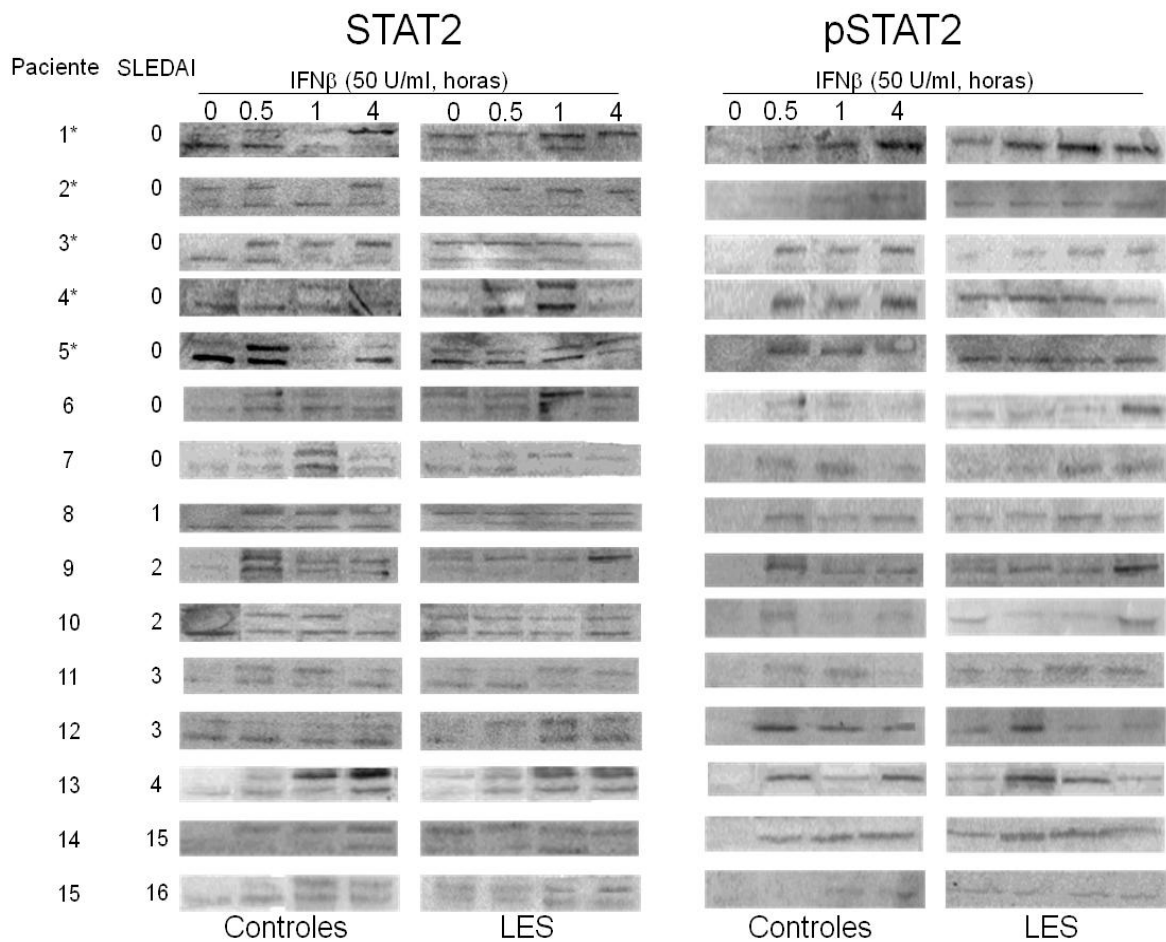


Fig. 8. Fosforilación constitutiva de STAT2 en LES. Se muestran los western blots para STAT2 y p-STAT2 de los 15 pacientes con LES analizados, clasificados de acuerdo a la escala SLEDAI, comparándolos con controles sanos, a los tiempos de estímulo con IFN β indicados. Los pacientes con asterisco se encuentran en remisión de la enfermedad.

En la figura 9 se muestra que el patrón de expresión de IFNAR1 y IFNAR2 en CMN de controles y pacientes con LES es muy similar, y no se detectan variaciones en la expresión con respecto al tiempo de estímulo con IFN β . La expresión similar de IFNAR1 y IFNAR2 en pacientes con LES y controles sanos indica que el aumento en la vía de señalización por IFN en LES no se debe a diferencias en la expresión de los receptores.

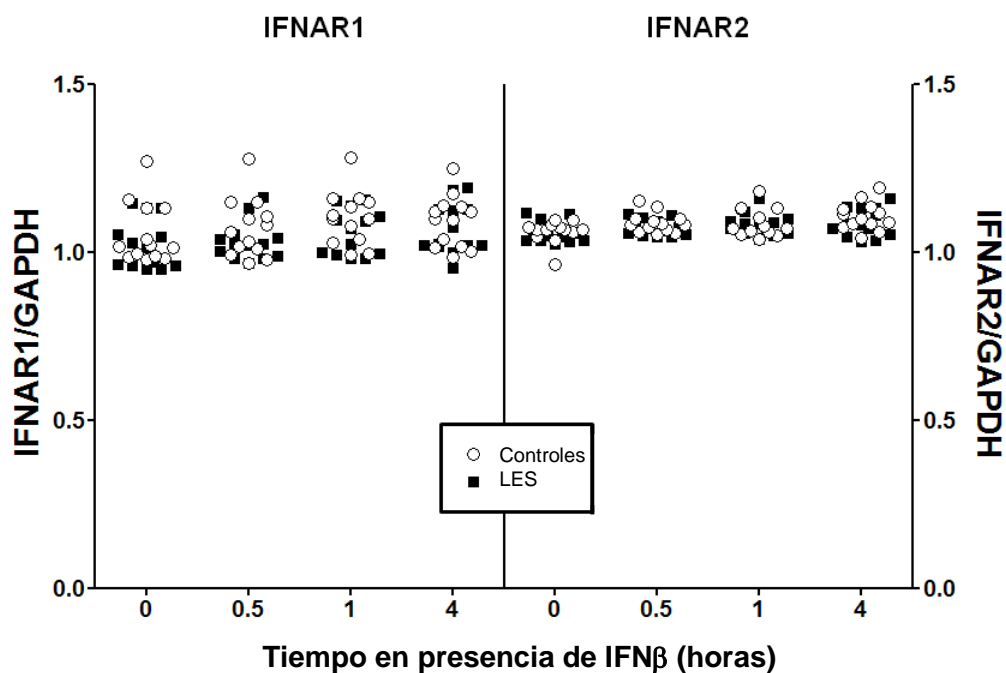


Fig. 9. Niveles similares de expresión de las cadenas IFNAR1 y IFNAR2 en CMN de pacientes con LES y controles sanos. Valores densitométricos del análisis de Western blot IFNAR1/GAPDH y IFNAR2/GAPDH de lisados proteicos obtenidos de CMN de pacientes con LES (cuadros, n=15) y controles sanos círculos, n=15) antes (tiempo 0) y a tiempos diferentes después de la adición de 50U/mL de IFN β humano recombinante. LES inactivo incluye pacientes con SLEDAI 0-4 y LES activo comprende pacientes con SLEDAI > 4.

Estos resultados sugieren que en LES existe un estado continuamente activado de la vía de señalización por IFN-I, lo cual, dados los resultados previamente mostrados, podría ser una consecuencia de la falta de mecanismos reguladores de la vía, tales como la disminución de SOCS1.

Debido a que nuestros resultados en western blot muestran que la fosforilación de Jak1 y STAT2 es mayor en pacientes con LES activo comparada con LES inactivo, llevamos a cabo un análisis de correlación de Pearson para detectar alguna relación directa entre la fosforilación de estas proteínas y la actividad de

la enfermedad, como una escala continua. La Figura 10 muestra que no hubo correlación entre el índice de actividad de la enfermedad (SLEDAI) y la fosforilación de Jak1 o STAT2.

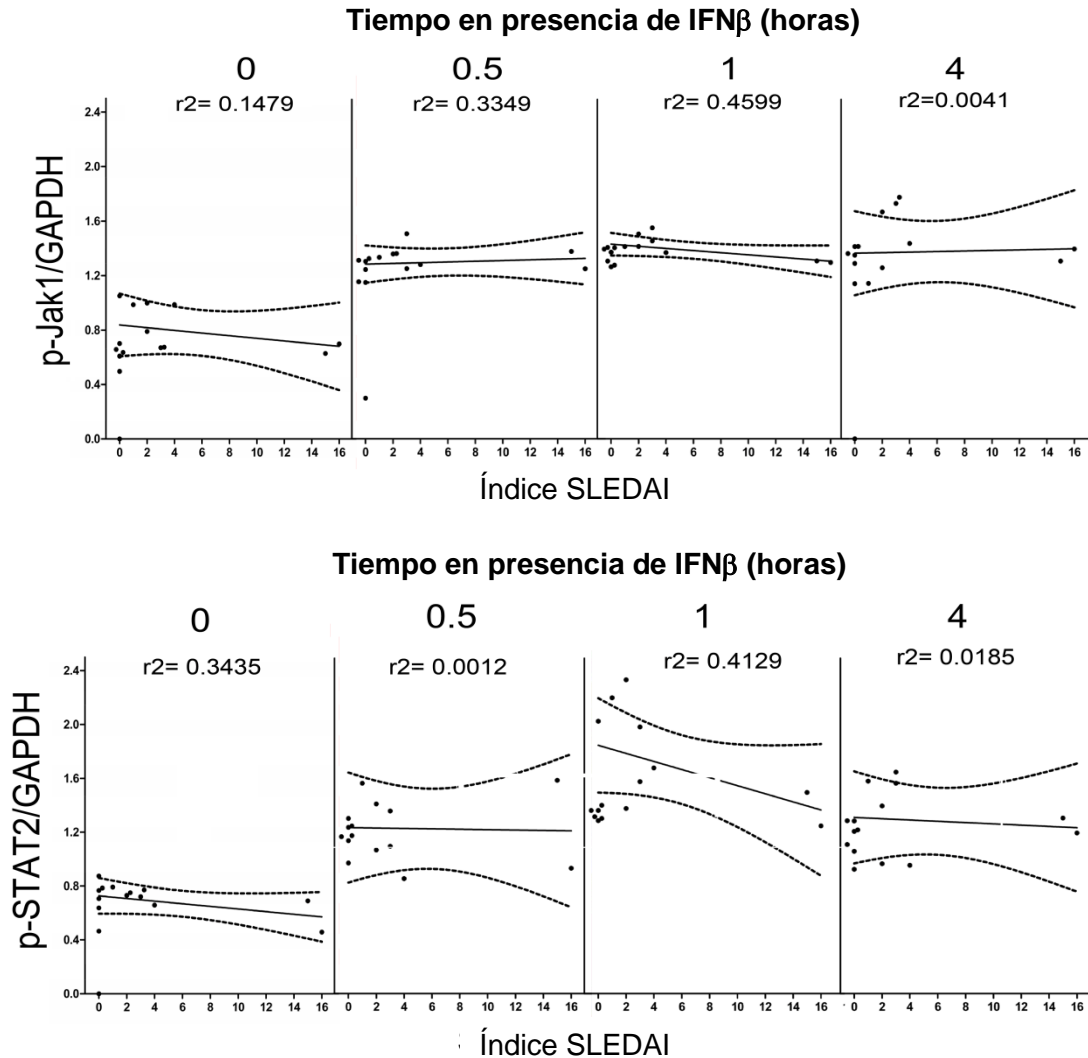


Figura 10. No existe correlación entre la fosforilación constitutiva de Jak1 o STAT2 y el índice de actividad de la enfermedad en CMN de pacientes con LES. Análisis de regresión logística de pJak1/GAPDH y pSTAT2/GAPDH en pacientes con LES (eje Y) y el índice de actividad de la enfermedad (eje X) antes (tiempo 0) o a los tiempos indicados después de la adición de 50 U/ml IFN β .

Expresión disminuida de SOCS1 en LES.

Debido a que la sobreexpresión de genes inducidos por IFN tipo I en LES podría deberse a un aumento en la producción de IFN-I o, alternativamente, a un aumento en la señalización de la vía de transducción de señales, decidimos analizar la posibilidad de que existiera una falla en la supresión de la vía Jak/STAT. Al ser SOCS1 el inhibidor mejor caracterizado de la vía de señalización de IFN-I y además, porque su deficiencia parcial se ha asociado con un síndrome semejante al LES (SLE-like síndrome) [105], analizamos su expresión en CMN de pacientes con LES comparada contra controles sanos.

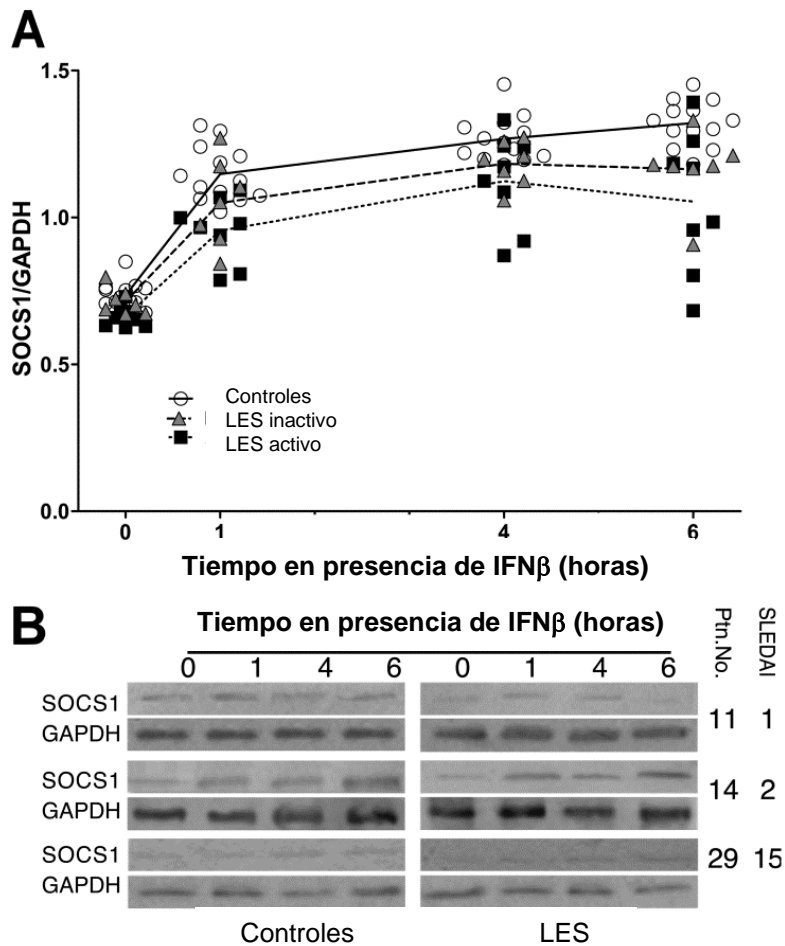
Se extrajeron CMN de controles sanos y de pacientes con LES clasificados de acuerdo a la actividad de la enfermedad mediante la escala SLEDAI, considerando dos grupos: inactivos (SLEDAI 0) y activos (SLEDAI >0), y se incubaron en medio RPMI o en medio RPMI en presencia de estímulo de 50U/mL de IFN β por diferentes periodos de tiempos (1, 4 y 6h). Posteriormente se extrajeron los lisados proteínicos, los cuales se corrieron en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF, mismas que después se revelaron con anticuerpos contra SOCS1.

La figura 11A muestra el análisis densitométrico de las bandas obtenidas por western blot de lisados proteínicos de CMN provenientes de controles sanos o pacientes con LES con anti-SOCS1. Como puede observarse, la expresión de la proteína SOCS1 intracelular total estaba disminuida en todos los pacientes con LES, pero solamente fueron significativas las diferencias entre pacientes con LES activo y controles sanos ($p=0.0007$). Debido a que la expresión de SOCS1 es inducida por varias citocinas, incluyendo IFN-I, también analizamos la expresión de SOCS1 en presencia de IFN β . Las CMN de controles sanos y pacientes con LES fueron estimuladas por diferentes periodos de tiempo (1, 4 y 6h) con 50U/mL de IFN β , y posteriormente se extrajeron las proteínas, que se analizaron por Western blot.

En la figura 11A se observa que en controles sanos, la cinética de la expresión proteínica de SOCS1 aumenta ante un estímulo de IFN β , manteniéndose así aproximadamente hasta las 6h. Sin embargo, en pacientes con LES, se observó menor expresión de la proteína desde el tiempo 0, y pese a que ante un estímulo ésta también aumentó, no alcanzó los niveles de expresión de los controles (después de 6h en presencia de IFN β , controles vs LES activo $p<0.0001$; controles

vs. LES inactivo $p=0.0008$). Además, en pacientes con LES, la proteína SOCS1 comenzó a disminuir su expresión a las 4h, siendo esta disminución más evidente a las 6h, mientras que en controles sanos, la expresión de la proteína se mantuvo a las 4h e incluso siguió aumentando hasta las 6h en presencia de $IFN\beta$. Notablemente, esta disminución ocurrió también en pacientes con LES inactivo, aunque fue más marcada en los pacientes con LES activo (después de 4h en presencia de $IFN\beta$, controles vs LES activo $p=0.0058$; controles vs LES inactivo $p=0.0144$)

La figura 11B muestra blots representativos de SOCS1 en tres pacientes con LES y tres controles sanos, en las cuales se puede observar la disminución en la expresión de SOCS1 en pacientes con LES comparada con controles sanos. La figura 11C muestra los blots para SOCS1 de todos los pacientes analizados comparados contra controles sanos.



Es importante mencionar que el cultivo en ausencia de IFN-I no indujo SOCS1 en CMN control (Figura 12), por lo que el efecto de la inducción de la proteína puede adjudicarse al estímulo proporcionado con IFN β .

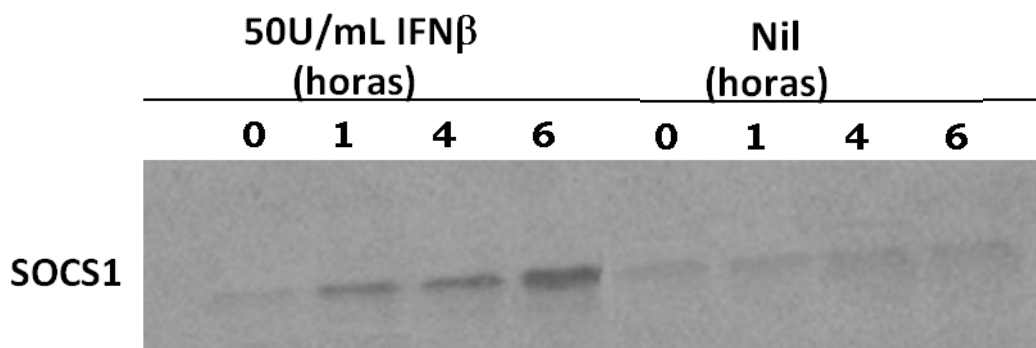


Figura 12. El cultivo de CMN en ausencia de IFN-I no induce expresión de SOCS1. Lisados proteínicos de CMN de un control sano cultivadas en ausencia o en presencia de IFN β durante los tiempos indicados en la parte superior, analizados por western blot para SOCS1.

Habiendo detectado la expresión disminuida de SOCS1 en pacientes con LES tanto activo como inactivo, era de interés investigar si existe una relación directa entre la actividad de la enfermedad y la disminución de la proteína. Sin embargo, después de llevar a cabo un análisis de correlación de Pearson, no encontramos una correlación entre la expresión disminuida de SOCS1 en CMN de LES y el índice de actividad de la enfermedad (definida por la escala SLEDAI), ya fuera en presencia o en ausencia de IFN β (Figura 13).

Estos resultados indican que, en pacientes con LES, tanto la expresión constitutiva de SOCS1 y su inducción por IFN β se encuentran disminuidos, y esta disminución no está relacionada con la actividad de la enfermedad.

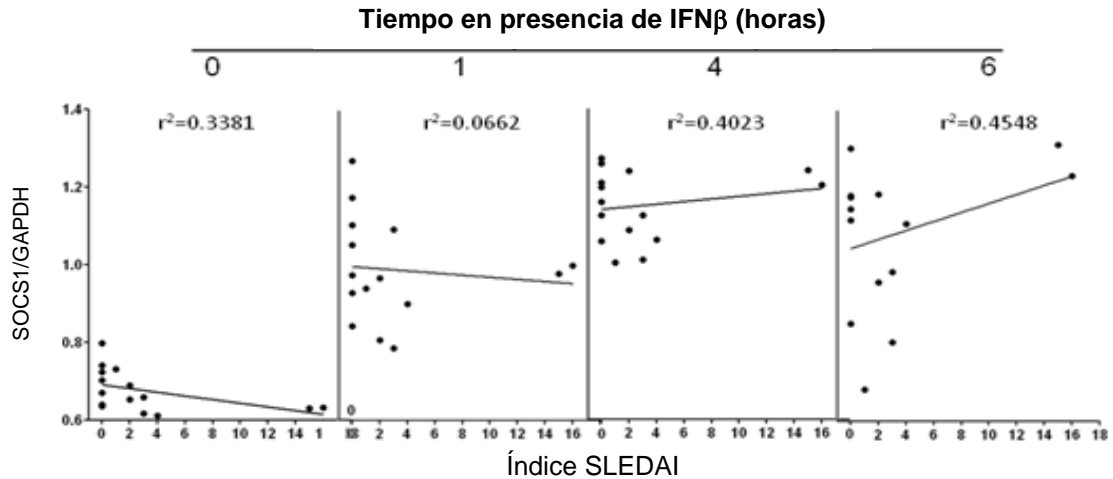


Figura 13. No existe correlación de la expresión de SOCS1 con el índice de actividad de la enfermedad en CMN de pacientes con LES. Los datos de los pacientes con LES se graficaron para examinar la correlación de la expresión de SOCS1/GAPDH y el índice de actividad de la enfermedad (SLEDAI) en pacientes con LES (eje X). El tiempo 0 representa los lisados celulares sin la adición de IFN β exógeno, mientras que las columnas numeradas 1, 4 y 6 se refieren al tiempo de cultivo después de la adición de 50U/mL de IFN β recombinante humano.

Dado lo pequeño de las diferencias en la expresión de SOCS1 en pacientes con LES observadas por el análisis de western blot, decidimos examinar los niveles de mRNA de SOCS1 en pacientes con LES activo e inactivo y controles sanos. Para esto, se realizó análisis por medio de RT-PCR tiempo real para SOCS1 en pacientes con LES activo e inactivo y en controles sanos, comparada con la expresión GAPDH. El RNA total obtenido de las CMN de pacientes con LES o controles sanos se utilizó para sintetizar cDNA con ayuda de un kit comercial (ver sección de Métodos). Para determinar la dilución ideal de RNA a utilizar en el ensayo, se realizó una curva estándar, con diluciones seriadas de cDNA (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) de un control sano y la sonda de GAPDH. Se realizó una curva estándar en la cual, se comprueba la efectividad de la sonda y la precisión del ensayo ($r^2=0.9987$), además de que se determina que el cDNA puede utilizarse a una dilución de 1:10000.

La figura 11, izquierda, muestra el análisis de RT-PCR tiempo real de mRNA de SOCS1, el cual se encontró significativamente disminuido en los pacientes con LES ($p < 0.0001$) comparado con controles sanos. A pesar de que las diferencias entre pacientes con LES inactivo y los controles sanos fueron estadísticamente significativas ($p = 0.036$), en los pacientes con LES activo se encontraron las diferencias más marcadas ($p < 0.0001$).

Estos resultados indican que los pacientes con LES tienen menor expresión de SOCS1 a nivel de mRNA. Sin embargo, era de vital importancia examinar si el estímulo con IFN-I era capaz de inducir la expresión de mRNA de SOCS1 en LES. Para analizar los efectos directos del IFN β en la transcripción de SOCS1, examinamos este proceso después de un estímulo corto (30 min). La figura 15 muestra que el IFN β es capaz de inducir un aumento en los niveles de mRNA de SOCS1 y, a pesar de que los niveles iniciales y finales (estimulado) fueron más bajos en LES, el aumento en LES y controles sanos fue proporcional (3-5 veces). Esto difiere de SOCS1 a nivel proteína, cuya expresión solamente aumentó sobre 2 veces en controles sanos y fue ligeramente menor en LES (Figura 11). Como un control muy importante, analizamos el mRNA de la proteína antiviral MxA, cuya expresión es inducida por IFN-I. Como puede observarse en la figura 11, derecha, MxA se encontró expresado a niveles basales bajos en controles sanos, mientras que en pacientes con LES estaba elevado, lo cual fue más marcado en respuesta al estímulo de 30 minutos con 50U/mL de IFN β , además de que fue mucho más evidente en pacientes con LES activo que en pacientes con LES inactivo.

A pesar de que estos hallazgos son consistentes en la mayoría de los pacientes con LES, dos pacientes con un índice de actividad muy elevado (SLEDAI 15) mostraron un aumento en mRNA de SOCS1, el cual aumentó aún más ante la presencia de IFN β . Estos dos pacientes no muestran ninguna diferencia clínica o serológica que los distinga de otros pacientes con LES con una actividad similar de la enfermedad. En el marco de nuestro estudio, interpretamos esto como un reflejo de la heterogeneidad en la patogénesis del LES, y ambos pacientes fueron considerados como independientes del grupo para análisis posteriores (aunque para evitar sesgos, se analizaron también en conjunto con los demás pacientes con LES). De manera importante, los dos pacientes con alta expresión de mRNA de SOCS1 no difirieron de los otros pacientes en la expresión de MxA. Por lo tanto, la expresión de SOCS1 en respuesta a IFN-I en LES se encuentra disociada de otros genes responsivos a IFN-I.

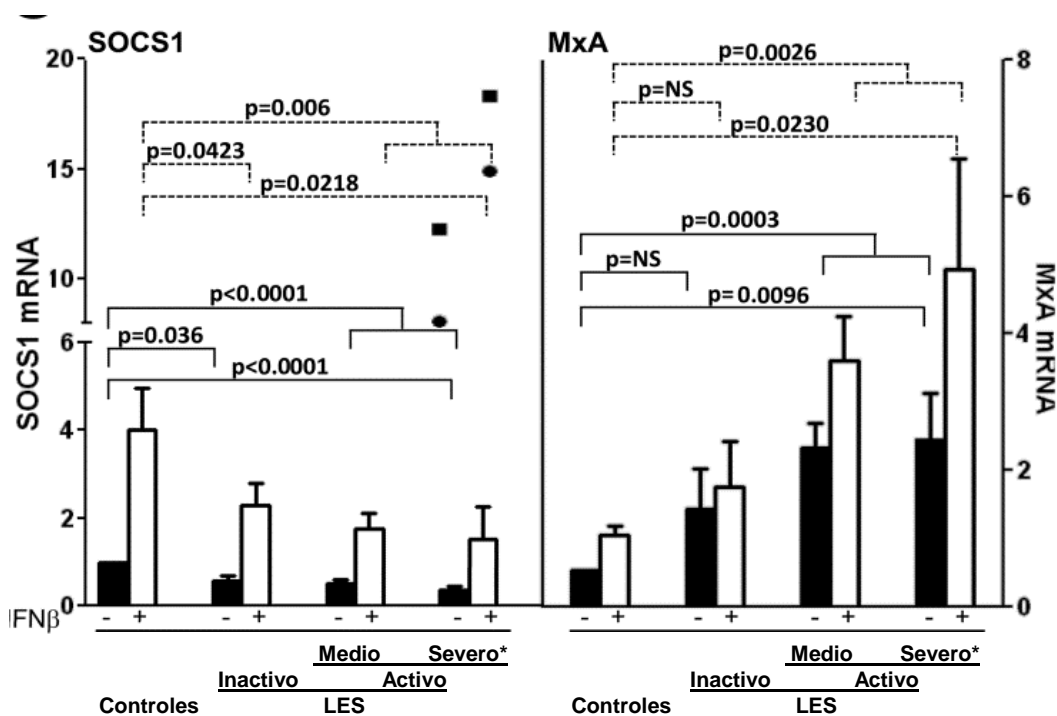


Figura 15. Expresión disminuida de mRNA de SOCS1 en pacientes con LES. RT-PCR en tiempo real a partir de RNA total de CMN de pacientes con LES (n=31) o controles sanos (n=31), antes (barras negras) o después (barras blancas) de cultivo en presencia de 50 U/ml IFN β . La expresión de SOCS1 está representada en la parte izquierda, mientras que la de MxA se localiza en la parte derecha. LES inactivo=SLEDAI 0 (n=9), LES activo medio=SLEDAI 1-4 (n=12) y LES activo severo =SLEDAI >4 (n=10). Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student para muestras no pareadas. Los dos puntos mostrados en las barras de SOCS1 sobre los pacientes activos severos corresponden a los pacientes con una expresión de SOCS1 elevada, y no se incluyeron en las barras correspondientes ni en el análisis estadístico (ver texto).

Posteriormente, llevamos a cabo un análisis de correlación de Pearson para determinar si había alguna relación directa entre la disminución de mRNA de SOCS1 y la actividad de la enfermedad de los pacientes con LES. Fuera de las dos excepciones mencionadas previamente (pacientes con índice de actividad elevado y aumento de mRNA de SOCS1), el mRNA de SOCS1 no correlacionó con la escala SLEDAI y, por lo tanto, con la actividad de la enfermedad, ya fuera que estos pacientes hubieran sido excluidos o no del análisis (Figura 16).

Estos resultados corroboran que, en pacientes con LES, la expresión de SOCS1 se encuentra disminuida, y esta disminución no está relacionada con la actividad de la enfermedad.

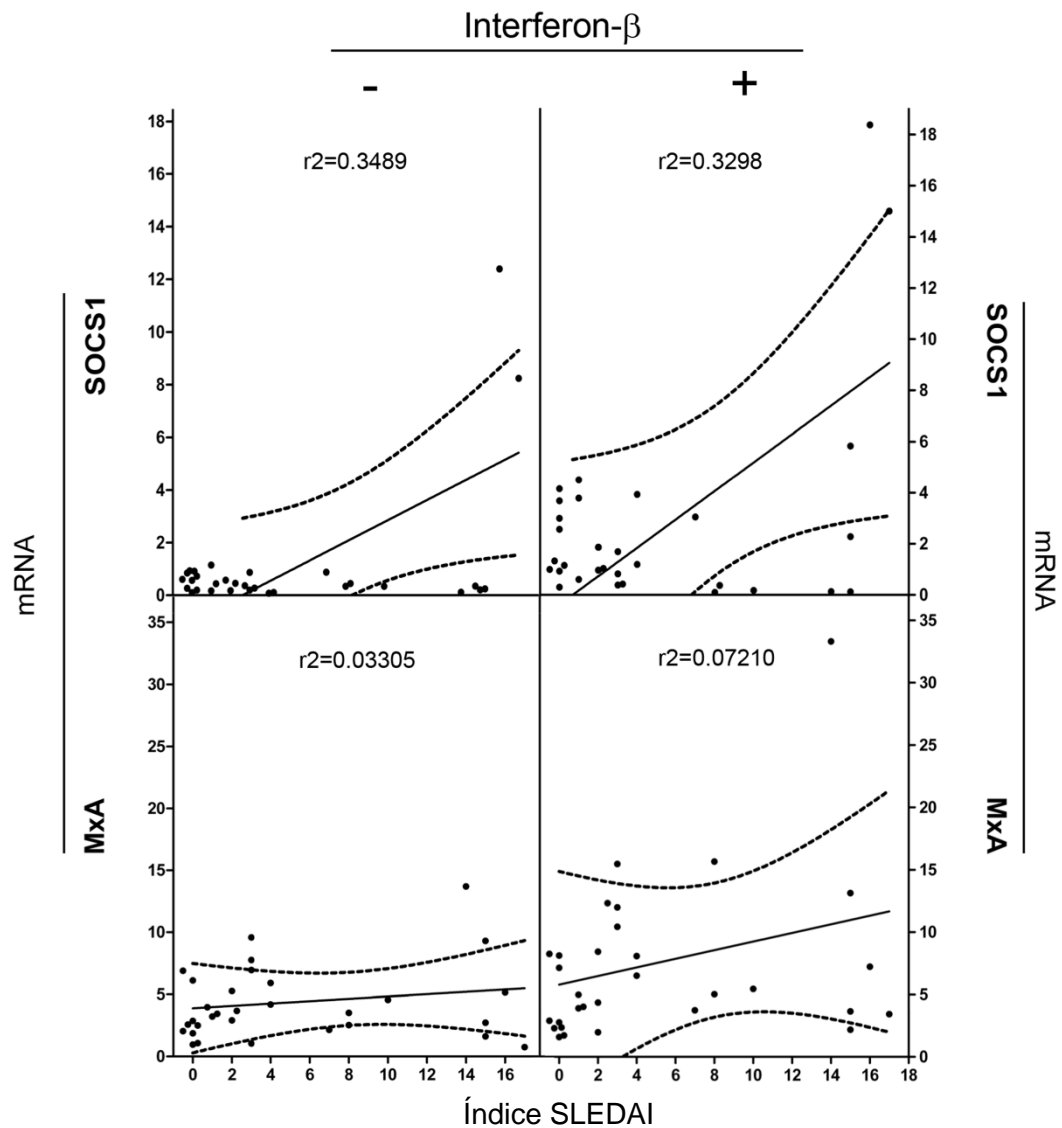


Figura 16. No existe correlación de la expresión de mRNA de SOCS1 con el índice de actividad del LES. Los datos de los pacientes con LES se graficaron para examinar la correlación de la expresión de mRNA de SOCS1 y el índice de actividad de la enfermedad (SLEDAI) (eje X). Las columnas marcadas como “-“ representan el mRNA de CMN sin la adición de IFNβ exógeno, mientras que las columnas marcadas como “+” se refieren al estímulo de 30 minutos con IFNβ recombinante humano exógeno. Arriba, mRNA de SOCS1; abajo, mRNA de MxA.

Actividad similar a IFN en el plasma de LES

La fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2 en CMN de LES puede deberse a la falta de regulación por parte de SOCS1, pero también podría deberse a la presencia de IFN en el suero de pacientes con LES. A pesar de que lo anterior no es muy probable para los pacientes con LES inactivo ya que se ha demostrado que el aumento de IFN-I en el suero de LES está asociado con la actividad de la enfermedad, decidimos analizar los niveles de IFN-I en el suero de los pacientes con LES.

La Figura 17 muestra los valores en pg/mL de IFN α presentes en el suero de los pacientes con LES comparados con controles sanos. Como puede observarse, solamente algunos pacientes con LES muestran valores elevados de IFN α y éstos no correlacionan con el índice SLEDAI. Además, en ningún caso un paciente con LES inactivo presentó niveles de IFN α superiores a aquellos de los controles. Sin embargo, se ha encontrado que el plasma de LES activo contiene una actividad similar a la de IFN-I, que puede ser neutralizada con anticuerpos anti-IFN α [105].

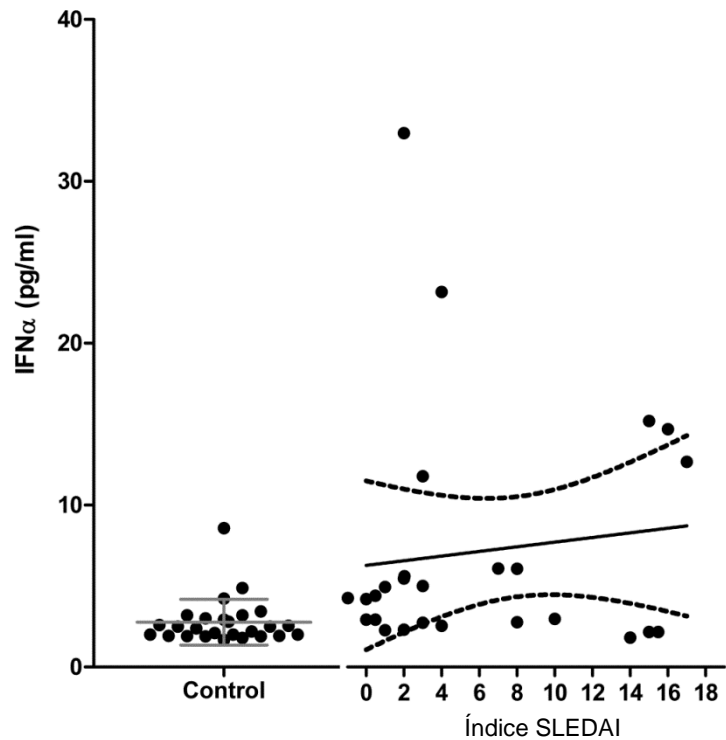


Figura 17. IFN α en suero no está uniformemente elevado en pacientes con LES y no correlaciona con la actividad de la enfermedad. Niveles de IFN α en muestras de suero de 26 pacientes con LES (derecha) y el mismo número de controles sanos (izquierda) con un kit comercial que detecta todas las isoformas de la citocina. Los datos de los pacientes con LES se graficaron para examinar la correlación con la actividad de la enfermedad de acuerdo al índice SLEDAI y se expresan en picogramos/mL. $R^2=0.03641$.

Para analizar los efectos del plasma de LES en CMN de controles, medimos la expresión de tres genes dependientes de IFN-I, 2'5OAS, MxA y EIF2 α , después de estimular CMN de controles sanos con plasma de LES activo e inactivo, y plasma control.

La Figura 18A, B y C muestra que, como era de esperarse, el plasma de controles no induce la expresión de los genes analizados. El plasma de LES activo induce una expresión muy elevada de mRNA de los tres genes (2'5OAS, MxA y EIF2 α). Sin embargo, solamente algunos de los plasmas de LES inactivo fueron capaces de inducir estos tres genes, pero en una menor proporción. La inducción de estos genes por el plasma de LES, correlaciona con el índice SLEDAI (Fig. 18D, E y F), particularmente 2'5'OAS. Esto sugiere que el plasma de LES, a pesar de que no contiene niveles elevados de IFN I consistentemente, posee una actividad

inductora de genes dependientes de IFN I, lo cual podría contribuir al aumento de genes inducidos por esta citocina en LES (sello de IFN).

A pesar de que en algunos pacientes con LES inactivo la fosforilación de Jak1 y STAT2 podría deberse a una actividad similar a la de IFN-I, algunos plasmas de LES inactivo no fueron capaces de inducir la expresión de los genes responsivos a IFN-I analizados en las CMN de controles. Para determinar la relación entre esta actividad similar a IFN-I en plasma de LES y la fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2, analizamos las CMN del paciente 21 (Tabla 1) mediante Western blot con un anticuerpo anti-pJak1, comparándolo contra CMN de un control. Las CMN se estimularon durante 1h con diferentes concentraciones de IFN β . Las CMN del paciente 21, quien presenta un índice SLEDAI de 2 y no mostró IFN α en plasma ni actividad inductora de 2'5OAS, MxA o EIF2 α , presentó una marcada fosforilación de Jak1 en ausencia de IFN-I exógeno, la cual no aumentó ante la adición de 50U/ml IFN β , a diferencia de las CMN del control, en las cuales no se detectó la presencia de Jak fosforilado en ausencia de IFN β , pero dicha fosforilación fue aumentando gradualmente al añadir el estímulo de IFN-I exógeno (Figura 18G). Esto sugiere que al menos en algunos pacientes con LES, la fosforilación de Jak1 y STAT2 es constitutiva e independiente del IFN exógeno.

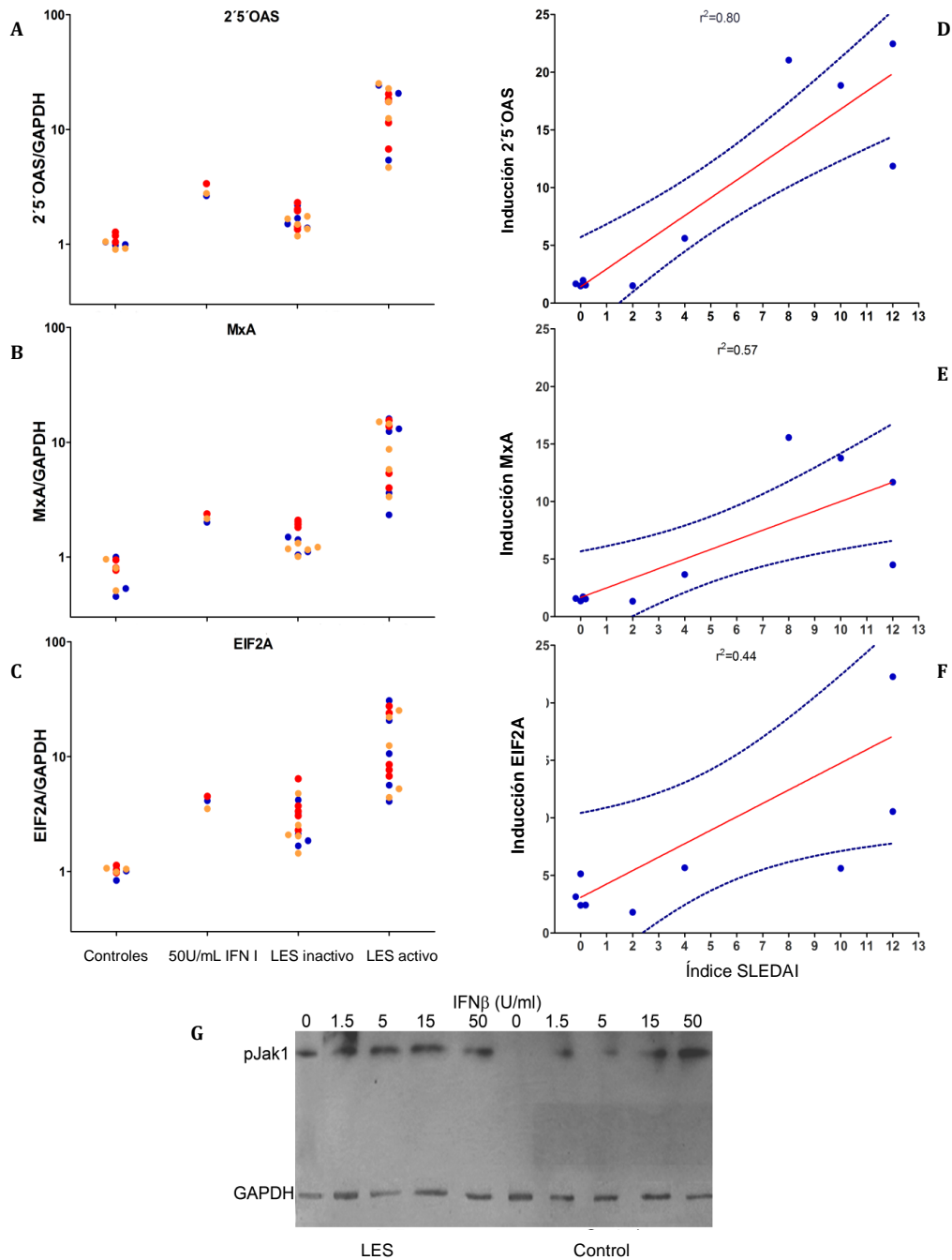


Figura 18. El plasma de LES activo induce expresión de genes dependientes de IFN-I. Se estimularon CMN de tres controles sanos durante 1h con plasma de 5 pacientes con LES activo, 5 LES inactivo y 3 controles sanos, o 50U/mL de IFN β recombinante, individualmente, y se examinó la inducción de tres genes dependientes de IFN-I: 2'5'OAS (**A**), MxA (**B**) y EIF2 α (**C**) mediante qRT-PCR (SYBR-Green). Las gráficas corresponden a tres donadores sanos (círculos). Cada color corresponde a un donador individual para los genes y condiciones indicados en cada columna (plasma control, 50U/mL IFN β , plasma de LES activo o inactivo). Los datos se expresan como la inducción de cada mRNA por arriba de PBMC sin estímulo. **D, E y F.** Correlación de Pearson entre la inducción de cada gen (media de CMN de los tres donadores sanos) y el índice SLEDAI. **D:** 2'5'OAS; **E:** MxA; **F:** EIF2 α . **G.** Western blots de los lisados de CMN de un paciente (izquierda) y un control sano (derecha) cultivados durante 1h con concentraciones progresivas de IFN β (0, 1.5, 5, 15 y 50 U/mL), reveladas con anti-pJak1.

Asociación entre la disminución de SOCS1 y la fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2 en LES

Debido a que SOCS1 regula a la proteína Jak1, impidiendo su fosforilación al actuar como pseudosustrato, y, por consiguiente, inhibiendo la fosforilación de STAT2, analizamos la posible correlación entre la disminución de la proteína SOCS1 y la fosforilación de Jak1 y STAT2. Al hacer el análisis individual de los pacientes (Fig. 19), observamos una correlación inversa entre la expresión de la proteína SOCS1 y la fosforilación de Jak1 y STAT2 en casi todos. Sin embargo, en tres pacientes (p-Jak1) y 4 (p-STAT2) no se observó este fenómeno, probablemente debido a la heterogeneidad de la enfermedad. Esta correlación inversa presente en la mayoría de los pacientes sugiere que la disminución de SOCS1 en LES es al menos responsable en parte por la activación constitutiva Jak1 y STAT2 encontrada en estos pacientes.

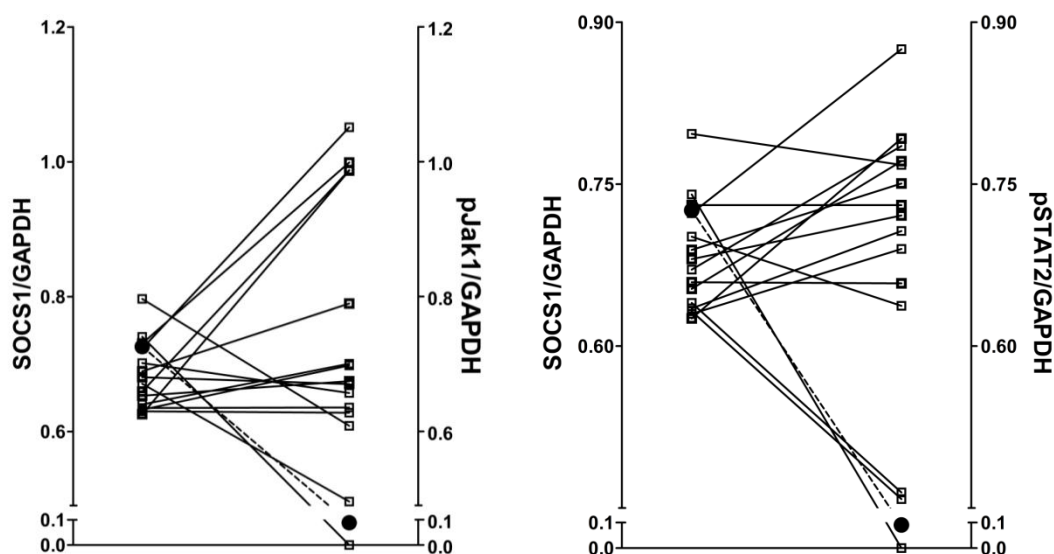


Figura 19. Correlación entre la expresión de SOCS1 y pJak1 o pSTAT2 en pacientes con LES. Comparaciones individuales de SOCS1 (eje X) y pJak1 (eje Y), derecha, y pSTAT, izquierda, en pacientes con LES (n=15), representados en cuadros blancos. El valor de la media de los controles sanos (n=15) se encuentra representado como círculos negros.

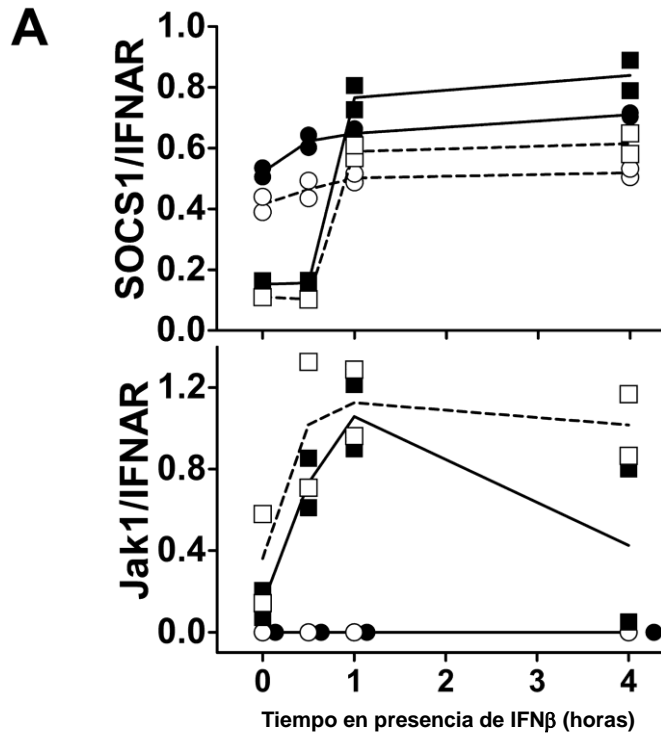
Asociación dependiente de ligando de SOCS1 con IFNAR2 y constitutiva con IFNAR1.

Es bien conocido el hecho de que Jak1 y STAT2 se asocian a la cadena IFNAR2, sin embargo, se ha sugerido que SOCS1 se asocia solamente con IFNAR1 y no con IFNAR2 [57]. Para reexaminar esto, hicimos estudios de coimmunoprecipitación para evaluar las características de la asociación de SOCS1 con las cadenas del IFNAR. Los lisados celulares de CMN de pacientes con LES o de controles sanos se inmunoprecipitaron con anti-IFNAR1, anti-IFNAR2, o con una mezcla de ambos, se corrieron en geles SDS-PAGE 12%, se transfirieron a PVDF y se revelaron con anticuerpos anti-Jak1, Tyk2 o STAT2. Como se esperaba, Tyk2 no se asoció a IFNAR2, pero se encontró constitutivamente asociado a IFNAR1, mientras que Jak1 y STAT2 están asociados constitutivamente con IFNAR2 (Figura 20B).

De manera importante, tal y como se ha reportado [57] en CMN sin estímulo, SOCS1 co-precipita principalmente con IFNAR1. Sin embargo, una hora después de la adición de IFN β , la asociación de SOCS1 con IFNAR2 aumentó marcadamente, mientras que solamente se observó un aumento marginal de SOCS1 asociado a IFNAR1 (Figura 20A y B). Por lo tanto, en ausencia de ocupación del IFNAR, SOCS1 se asocia solo a IFNAR1, pero la unión del ligando a IFNAR induce asociación de SOCS1 con IFNAR2.

En células de LES, la cantidad de SOCS1 unido a IFNAR1 y IFNAR2 estaba ligeramente disminuida en relación a los controles sanos, probablemente debido a una menor expresión de esta proteína en LES, o probablemente por un defecto en la región de unión con IFNAR. En cuanto a Jak1 y STAT2, se observó mayor asociación de las formas fosforiladas de estas proteínas al IFNAR en pacientes con LES que en controles sanos. Además, la asociación de Jak1 a IFNAR1 en LES se mantuvo hasta 6 horas después de la adición de IFN β , mientras que en controles sanos, ya comenzaba a declinar. También observamos que la unión al receptor de la forma fosforilada ya sea de Jak1 o STAT2 fue más notoria en pacientes con LES activo que en pacientes con LES inactivo.

Estos resultados indican que SOCS1 regula la señalización del IFNAR a través de ambas cadenas del receptor, pero la cinética es diferente, donde Tyk-STAT1 son regulados continuamente, mientras que la regulación de Jak1-STAT2 es inducible. La asociación de SOCS1 a IFNAR2 no era conocida.



Tiempo		0	30'	1h	4h	0	30'	1h	4h	0	30'	1h	4h
IP		IFNA R1				IFNA R2				IFNAR1/IFNAR2			
Control	WB Jak1	[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Paciente		[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Control	Tyk2	[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Paciente		[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Control	STAT2	[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Paciente		[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Control	SOCS1	[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Paciente		[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Control	Control de carga	[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			
Paciente		[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]				[Western Blot Bands]			

Tiempo		0	30'	1h	4h	0	30'	1h	4h	0	30'	1h	4h
IP		IFNA R1				IFNA R2				IFNAR1/IFNAR2			
Control	WB Jak1												
Control	Tyk2												
Control	STAT2												
Control	SOCS1												
Control	Control de carga												

Figura 20. Asociación constitutiva de SOCS1 con IFNAR1 en CMN y disminución de esta asociación en LES. A. Cinética de la asociación de SOCS1 (arriba) y Jak1 (abajo) con las cadenas del receptor a IFNAR antes (tiempo 0) y después del cultivo a los tiempos indicados en presencia de IFN β humano recombinante. **B.** Western Blots de las proteínas indicadas obtenido de lisados celulares de CMN de dos controles sanos (C) o dos pacientes con LES (P) co-inmunoprecipitado con IFNAR1 y IFNAR2, antes (tiempo 0) y después del cultivo a los tiempos indicados en presencia de IFN β humano recombinante.

Expresión de miRNA-155 en LES.

Los microRNA (miRNA) son reguladores importantes de la expresión génica que participan en procesos como la regulación de la activación de la respuesta inmune innata, inflamación y cáncer, entre otros. Además, se han identificado algunos miRNA que son inducibles en respuesta a ciertos estímulos. Uno de ellos, miR-155 es inducido por IFN β . Wang y colaboradores reportaron que SOCS1 es blanco de miR-155 en macrófagos, y que la eliminación de SOCS1 aumenta el efecto de miR-155 en la respuesta antiviral mediada por IFN-I. Por estas razones, y con los hallazgos previamente descritos, analizamos la expresión

de miR-155 en pacientes con LES y su posible relación con la deficiencia en la expresión de SOCS1. La figura 21 muestra, que la expresión de miR-155 en uno de los controles sanos está disminuida y no se modifica con el IFN β , mientras que el paciente con LES activo presenta mayor expresión basal de miR-155, la cual disminuye con el IFN β . Esto es congruente con la baja expresión basal de SOCS en los dos pacientes activos, en los que el IFN β induce SOCS1. Los pacientes con LES inactivo tienen mayor expresión basal de miR-155 que el control y menos que el paciente con LES activo. Aunque estos resultados sugieren que en LES, la expresión de SOCS1 pudiera ser regulada por miR-155, los datos son muy preliminares y requieren confirmación.

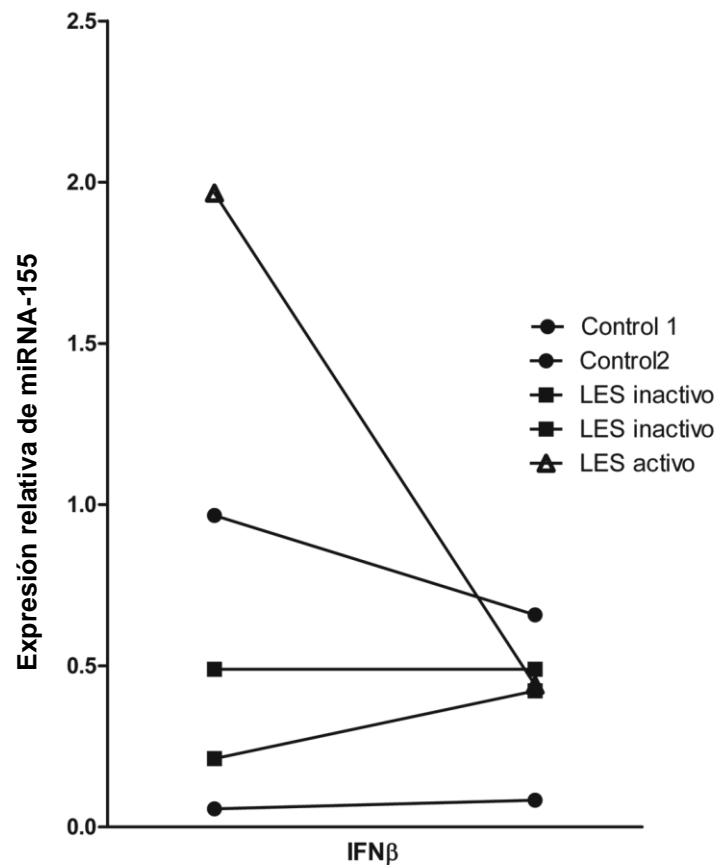


Fig. 21. Expresión de miR-155 en LES. Se muestran los valores de expresión de miRNA-155 en CMN de pacientes con LES y controles sanos, analizados mediante qRT-PCR.

Discusión

Diversas observaciones han demostrado el papel primordial de la vía de IFN-I en la etiopatogénesis del LES. Este trabajo se realizó para examinar el estado de la vía de señalización inducida por IFN-I en células de pacientes LES. Para ello, se examinó el estado de fosforilación de las proteínas de señalización asociadas a IFNAR, Jak1 y STAT2. El hallazgo más notable de este trabajo fue que tanto Jak1 como STAT2 se encontraron constitutivamente fosforiladas en pacientes con LES activo e inactivo. Los pacientes con LES inactivo y algunos con LES activo no tenían IFN α elevado en suero ni actividad similar a IFN-I en plasma, determinada por la capacidad o no de plasma normal de inducir transcripción de genes dependientes de IFN-I. Para examinar si la fosforilación constitutiva del complejo de transducción de señales asociado a IFNAR se debía a la falla de alguno de sus mecanismos reguladores, estudiamos la expresión del regulador principal de la señalización del IFNAR, SOCS1. Aunque se encontró una disminución de SOCS1 tanto a nivel de mRNA como de proteína, no tuvo correlación estrecha con la fosforilación de Jak1 y STAT2. Finalmente, se encontró que SOCS1 se une a ambas cadenas de IFNAR, pero con diferente cinética, y la unión a ambas cadenas de IFNAR está disminuida en LES.

El LES es una enfermedad heterogénea, en la cual concurren combinaciones variables de múltiples polimorfismos en genes que en conjunto contribuyen a su susceptibilidad [3-7]. Uno de los aspectos más relevantes que han surgido en la última década, es que los pacientes con LES tienen la vía de IFN-I constitutivamente activada, aunque los niveles de IFN α en suero no siempre se encuentran elevados ni siempre correlacionan con la actividad de la enfermedad [45-48]. Esto, además de que algunos individuos desarrollan LES después de la administración de IFN-I exógeno [52, 53], sugiere que el defecto en LES, más que una producción persistente y aumentada de IFN-I, podría ser que su receptor, IFNAR, tuviera un umbral bajo de respuesta a la citocina. Nuestros resultados son consistentes con esta hipótesis.

En este estudio encontramos que, en pacientes con LES, la vía de señalización Jak/STAT inducida por IFN-I se encuentra activada, aparentemente en ausencia de un estímulo externo, tal como se pone en evidencia mediante la fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2 (proteínas asociadas a IFNAR) sin la adición de IFN-I exógeno. Además, la fosforilación de estas proteínas aumenta en respuesta al

estímulo y se mantiene por tiempos más prolongados comparada con controles sanos. Esto indica que este receptor señala en forma continua, pero que es aún capaz de responder a un estímulo exógeno, que al cesar regresa a un estado basal, que está por arriba del presente en los individuos sanos. Este hallazgo concuerda con estudios previos y sugiere que el LES se asocia a una respuesta aumentada a IFN-I.

Cabe mencionar que en los estudios llevados a cabo en este trabajo utilizamos IFN β para el estímulo de las células, y aunque se realizó la determinación cuantitativa en suero de IFN α , los resultados pueden interpretarse como en general de IFN-I, debido a que ambos subtipos pertenecen a la misma clase de IFN y señalizan a través del mismo receptor celular, además de que diversos estudios han detectado que tanto IFN α como IFN β activan los mismos genes [68, 77].

Para investigar la posibilidad de que el umbral anormal de respuesta del IFNAR se debiera a una regulación defectuosa del mismo, estudiamos la expresión de SOCS1. Aunque la mayoría de los pacientes estudiados tuvieron expresión baja de SOCS1, el análisis de correlación de Pearson no mostró una asociación entre la disminución de SOCS1 y la fosforilación de Jak1 y STAT2, aunque se observa una clara tendencia con relación inversa entre dichas variables. Esto sugiere que en estos pacientes existen otras vías alteradas como responsables de la activación constitutiva del IFNAR. Otra posibilidad es que esta activación sea producto de la acción de otra citocina, que, de manera *trans*, estuviera activando la vía Jak/STAT de IFN-I, probablemente IFN-II, ya que el pretratamiento con esta citocina sensibiliza las células a IFN-I, y se sabe que la expresión de transcritos dependientes de IFN-II está significativamente elevada en CMN de pacientes con LES. Este aumento en la producción de IFN-II en LES podría desencadenar y mantener las respuestas inflamatorias características del padecimiento [120].

La disminución en la expresión de SOCS1 en LES ocurrió tanto a nivel proteína como de mRNA. Aunque la primera no fue tan marcada, la diferencia entre LES y controles sanos sin IFN β exógeno fue estadísticamente significativa. Al añadir IFN β (1, 4 y 6h), estas diferencias fueron cada vez más evidentes, mientras que en controles sanos, la expresión de SOCS1 aumentó con el tiempo de estímulo, alcanzando un máximo entre las 4 y 6 horas. En los pacientes con LES, SOCS1 aumentó pero nunca alcanzó los niveles de los controles, y a partir de las 4 horas

se observó una clara disminución de su expresión, mientras en los controles seguía aumentando.

La disminución en la expresión de SOCS1 tampoco mostró una correlación con la actividad de la enfermedad. Probablemente, existen mecanismos alternos de regulación de la vía de IFN-I que podrían controlar una hiperrespuesta de esta citocina. Debido a que nuestros experimentos se basaron en la detección global de las proteínas y no en su localización celular, y ya que consistentemente encontramos Jak1 y STAT2 fosforilados, y asociados a IFNAR, es probable que uno de los mecanismos involucrados que intente controlar la vía sea el de PIAS, que se encarga de la inhibición de las STAT activadas en el núcleo [97, 98]. Esto podría explicar por qué en algunos de los pacientes analizados en este estudio Jak1 y STAT2 no se encontraron fosforiladas en ausencia de estímulo.

La mayoría de los pacientes con LES analizados en este estudio, sin importar su índice SLEDAI, mostraron una expresión disminuida de SOCS1 a nivel de mRNA, con respuesta a IFN β disminuida *in vitro*, con una relación inversamente proporcional con la expresión del gen de la proteína antiviral MxA, inducible por IFN-I. Es decir, los pacientes con LES inactivo tenían expresión disminuida de SOCS1 con elevación de MxA, mientras que los pacientes con LES inactivo en quienes la disminución de SOCS1 no fue evidente, no tenían elevación de MxA. Esto sugiere fuertemente que SOCS1 regula la expresión de MxA a través de la inhibición del IFNAR. Interesantemente, dos de los pacientes más activos tuvieron expresión muy elevada del mRNA de SOCS1 (pero no de MxA). Estos dos pacientes tenían la transcripción de SOCS1 más alta en respuesta a IFN β , pero no diferían de los otros pacientes en cuanto a características clínicas o étnicas, por lo cual, sólo podemos atribuirlo a la heterogeneidad del LES.

La activación constitutiva de la vía de IFN-I o el estímulo persistente que provoca dicha activación podría deberse a niveles elevados de esta citocina en el suero de los pacientes con LES. Sin embargo, solamente una fracción de los pacientes con LES activo mostraron niveles elevados de IFN α en plasma comparado con controles sanos y la presencia de IFN α en suero no correlacionó con la actividad de la enfermedad. El plasma de pacientes con LES activo (n=5) fue capaz de inducir la producción de genes de IFN-I en CMN sanas (*in vitro*), ya que al estimular las CMN sanas con plasma de LES activo, encontramos una clara inducción de mRNA de los genes dependientes de IFN-I analizados (2'5OAS, MxA y EIF2 α) con una fuerte

correlación con el índice SLEDAI, particularmente para 25 OAS. Esto indica que el plasma de pacientes con LES activo posee cierta actividad inductora de IFN-I, los cuales podrían ser complejos inmunes típicos de LES (DNA-anti-DNA) que podrían inducir la producción de interferón a través del estímulo por TLR9 [53]. A pesar de que utilizamos un kit de ELISA multivalente para IFN α , no pudimos detectar niveles elevados de esta citocina, por lo que queda abierta la posibilidad de estudiar más a fondo e identificar el factor que le confiere al plasma de LES activo su capacidad inductora de genes dependientes de IFN-I.

Sorpresivamente, los plasmas de pacientes con LES inactivo (que tampoco presentan IFN α detectable en suero) no mostraron esta actividad inductora de IFN-I y aún así, tienen fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2. Esto apoya la hipótesis de que la activación constitutiva de IFNAR en LES podría ser por una falla en su regulación.

En condiciones normales, en ausencia de IFN β exógeno, Jak1-STAT2 co-precipitan con IFNAR2, y Tyk2-STAT1 con IFNAR1, lo cual aumenta ante la adición de IFN-I, y no encontramos diferencias significativas de asociación de estas proteínas a IFNAR entre pacientes con LES y controles sanos. Hasta antes de este estudio, sólo se había encontrado que, en el IFNAR, SOCS1 se asocia únicamente a IFNAR1 por lo que se propuso que su efecto inhibitor sería sólo a nivel de Tyk2/STAT1 [42]. Nuestros resultados confirmaron que este es el caso, pero sólo en ausencia de IFN exógeno, ya que al cultivar CMN en presencia de IFN β , SOCS1 se asoció progresivamente a IFNAR2, mientras que su asociación con IFNAR1 sólo se modificó marginalmente. Esto no ha sido previamente publicado y sugiere un modelo en el que la señalización inicial inducida por IFN-I se desarrolla principalmente a través de IFNAR2 hasta que SOCS1 es inducido y se une a ella. SOCS1 entonces bloquearía la señalización por IFNAR2 sin disminuir significativamente la señalización por IFNAR1. La asociación de SOCS1 a IFNAR1 y IFNAR2 siempre fue más baja en los pacientes con LES que en controles sanos, lo cual indica que la señalización por ambas cadenas podría estar incrementada en LES.

Como se indica por estudios epidemiológicos, la concordancia de LES se encuentra fuertemente influenciada por factores genéticos. A la fecha, varios estudios han encontrado múltiples genes asociados y que podrían estar implicados en la patogénesis de LES. SOCS1 es el principal regulador de la vía de señalización por

IFN-I, además de ser el regulador principal de la actividad de otras citocinas que participan en la inmunopatogénesis del LES. La disminución de SOCS1 encontrada en algunos pacientes, sobre todo a nivel de mRNA y aún en pacientes con LES inactivo, sugiere que SOCS1 pudiera ser otro gen de susceptibilidad al LES. En este contexto, es importante hacer notar que se ha identificado un locus de susceptibilidad a LES en el cromosoma 16 proximal, y que tiene influencia sobre los títulos de anticuerpos anti-dsDNA [108]. Debido a que SOCS-1 se encuentra ubicado en la misma región del cromosoma 16, SOCS-1 es un candidato para este locus de susceptibilidad.

En conclusión, el hallazgo de la fosforilación constitutiva de las proteínas de señalización asociadas a IFNAR en LES sugiere fuertemente que la sobreexpresión de los genes inducidos por IFN-I en esta enfermedad podría explicarse, al menos en parte, por un aumento en la sensibilidad del IFNAR. El papel de la disminución de SOCS1 en el aumento de la señalización por IFNAR en algunos pacientes con LES permanece como una posibilidad que debe ser examinada más a fondo. En este estudio encontramos una disminución de SOCS1 en pacientes con LES, y proponemos esta disminución como una de las causas de la señalización aberrante por IFN-I. De comprobarse y establecerse como una característica reproducible y heterogénea de LES, sugeriría un nuevo rol de SOCS1 en la supresión de autoinmunidad sistémica, específicamente como se muestra en este trabajo, de LES.

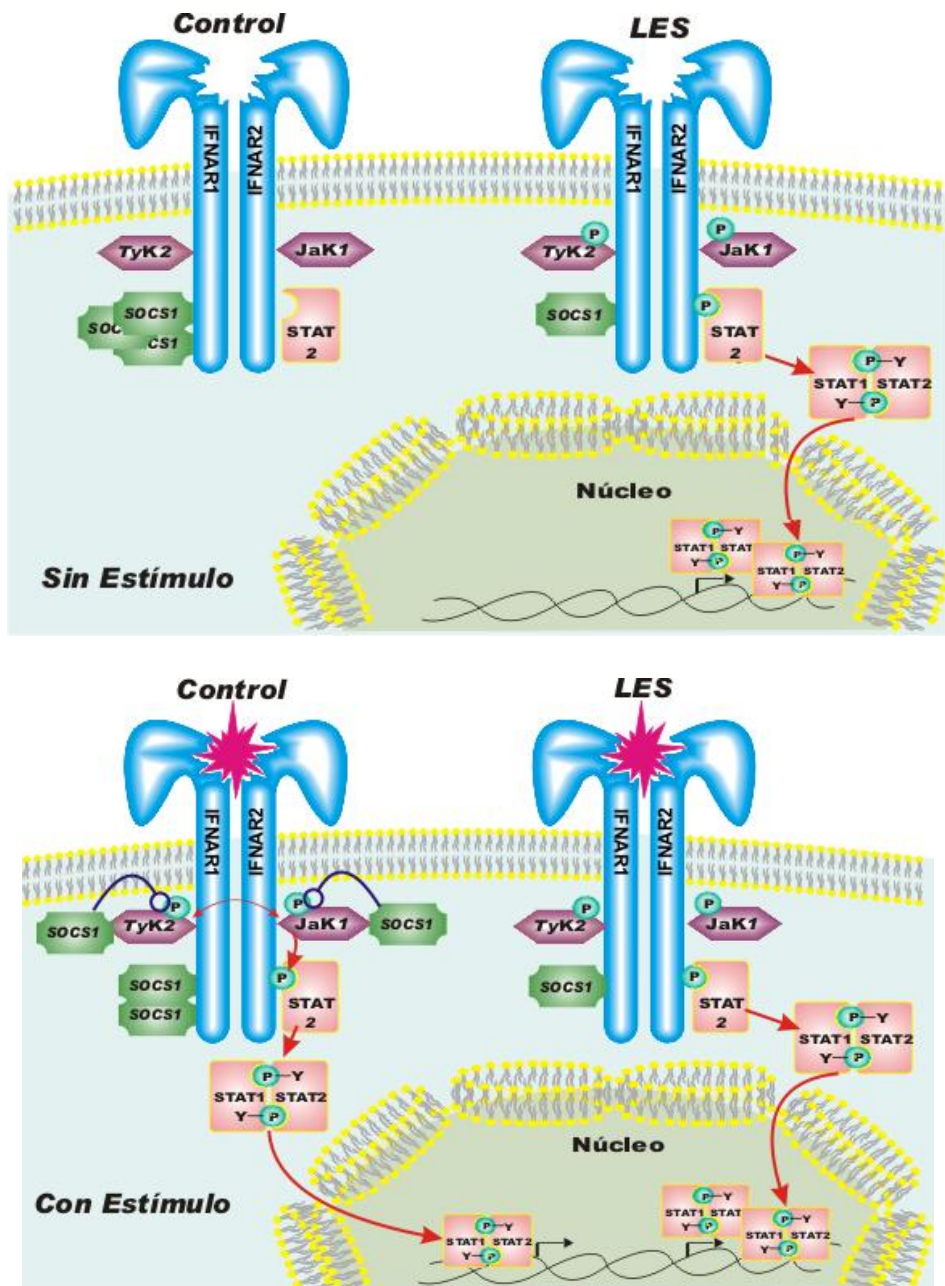


Fig. 22. Vía de señalización Jak/STAT en LES y controles sanos. En este estudio encontramos que en condiciones normales, en ausencia de IFN-I exógeno, Jak1-STAT2 co-precipitan con IFNRA2, lo cual aumenta ante la adición de IFN-I. Tyk2-STAT1 y SOCS1 se asocian a IFNAR1. Ante un estímulo exógeno, SOCS1 se asocia progresivamente a IFNAR2, mientras que su asociación con IFNAR1 sólo se modifica marginalmente. Esta asociación de SOCS1 es menor en LES que en controles sanos.

En CMN de LES, existe una fosforilación constitutiva de Jak1 y STAT2, que persiste a tiempos prolongados, a diferencia de controles sanos, en los cuales la fosforilación solamente se observa ante el estímulo con IFN I y comienza a decaer después de la primera hora de estímulo. Encontramos una disminución en la expresión de SOCS1 en CMN de LES comparado con controles sanos. La deficiencia de SOCS1 en CMN de LES podría contribuir al aumento de la fosforilación de Jak1 y STAT2, y por lo tanto, la hiperactivación de la vía inducida por IFN I característica de LES.

Conclusión

La fosforilación constitutiva de las proteínas de señalización asociadas a IFNAR en pacientes con LES, con o sin niveles elevados de IFN α en suero, indica que la sobreexpresión de los genes inducidos por IFN-I (sello de IFN) en esta enfermedad podría explicarse por un aumento en la sensibilidad del IFNAR.

Una de las causas de esta señalización aberrante en LES podría ser la regulación defectuosa de la vía inducida por IFN-I, a través de SOCS1, cuya expresión se encontró disminuida en pacientes con LES analizados en este estudio.

Perspectivas

- Analizar la expresión de SOCS1 en una muestra de mayor tamaño de pacientes con LES para confirmar su significancia estadística dentro del universo de pacientes con esta enfermedad, así como su relación con la actividad de la enfermedad. Dependiendo de los resultados, evaluar si podría establecerse como una característica determinante o un marcador en el diagnóstico de LES.

- Confirmar la relación entre la disminución de SOCS1 y el aumento en la fosforilación de Jak1 y STAT2 (sobre todo Jak1), en una muestra de mayor tamaño de pacientes con LES.

- Confirmar los datos preliminares que sugieren que la expresión de SOCS1 podría ser regulada por miR-155, analizando la expresión de dicho miRNA en una muestra de mayor tamaño de pacientes con LES.

- Evaluar la expresión y funcionalidad de otros mecanismos reguladores de la vía de señalización por IFN β (PIAS, SHP-1) para determinar su participación en el sello de IFN en los pacientes con LES.

- Identificar y caracterizar al factor presente en el plasma de pacientes con LES que confiere la actividad similar a IFN I, y que es capaz de inducir la expresión de diversos genes regulados por esta citocina.

Apéndice I

INDICE DE ACTIVIDAD DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.SLEDAI

(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, Bombardier et al, 1992)

Puntuación	SLEDAI	Descriptor	Definición
8		Convulsiones	De comienzo reciente. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos.
8		Psicosis	Habilidad alterada para la función diaria debido a alteración grave en la percepción de la realidad. Incluye alucinaciones, incoherencia, asociaciones ilógicas, contenido mental escaso, pensamiento ilógico, raro, desorganizado y comportamiento catatónico. Excluir I. renal y fármacos
8		Sdme orgánico-cerebral	Función mental alterada con falta de orientación, memoria, u otras funciones intelectuales, de comienzo rápido y manifestaciones clínicas fluctuantes. Incluye disminución del nivel de conciencia con capacidad reducida para focalizar, e inhabilidad para mantener la atención en el medio, más, al menos dos de los siguientes: alteración de la percepción, lenguaje incoherente, insomnio o mareo matutino, o actividad psicomotora aumentada o disminuida. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos..
8		Alteraciones visuales	Retinopatía lúpica. Incluye cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudados serosos y hemorragias en la coroides, o neuritis óptica. Excluir HTA, infección o fármacos.
8		Alt. Pares craneales	De reciente comienzo, motor o sensitivo.
8		Cefalea lúpica	Grave, persistente; puede ser migrañosa pero no responde a analgésicos narcóticos.
8		AVC	De reciente comienzo. Excluir arteriosclerosis.
8		Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos dolorosos sensibles, infartos periungueales, hemorragias en astilla o biopsia o angiografía que confirme la vasculitis.
4		Miositis	Debilidad proximal/dolor asociado a elevación de las CPK/aldolasa o EMG sugestivo o miositis comprobada por biopsia.
4		Artritis	Más de dos articulaciones dolorosas y con signos inflamatorios.
4		Cilindros urinarios	Cilindros hemáticos o granulosos.
4		Hematuria	>5 hematíes/c. Excluir litiasis, infección u otras causas.
4		Proteinuria	> 5 g/24 h. De reciente comienzo o aumento de la proteinuria ya conocida en más de 0.5 g/24 h.
4		Piuria	> 5 leucocitos/c. Excluir infección.
2		Exantema nuevo	Comienzo reciente o recurrente. Exantema inflamatorio.
2		Alopecia	De comienzo reciente o recurrente. Pérdida difusa o en placas.
2		Ulceras bucales	De comienzo reciente o recurrente. Ulceras bucales o nasales.
2		Pleuritis	Dolor pleurítico con roce o derrame, o engrosamiento pleural.
2		Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes: roce, derrame, cambios electrocardiográficos o confirmación ecocardiográfica.
2		Complemento	Descenso de CH50, C3, C4 por debajo del límite inferior del laboratorio.
2		Anti DNA	> 25%. Técnica de Farr o por encima del valor habitual del laboratorio.
1		Fiebre	> 38°C. Excluir infección.
1		Trombopenia	< 100.000 plaquetas/mm ³ .
1		Leucopenia	< 3.000 células/mm ³ . Excluir fármacos.
PUNTUACION TOTAL		<i>Nota: puntúa en la escala SLEDAI si el descriptor está presente en el día de la visita o 10 días antes.</i>	

Referencias

1. Lie BA, Thorsby E (2005) Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin in Immunol* 17: 526-531.
2. Steinberg AD, Melez KA, Raveche ES, Reeves JP, Boegel WA, et al. (1979) Approach to the study of the role of sex hormones in autoimmunity. *Arthritis Rheum* 22: 1170-1176.
3. D'Cruz D (2000) Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. *Toxicology Letters* 112: 421-432.
4. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL (2001) Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nature Medicine* 7(8): 899 - 905.
5. Perl A (2010) Pathogenic mechanisms in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 43: 1-6.
6. Kyttaris VC JY, Tsokos GC (2005) Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 17: 518-522.
7. Smith CD, Cyr M (1988) The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheum Dis Clin North Am* 14: 1-14.
8. Tan EM SP, Carr RI (1966) Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 45: 1732-1740.
9. Koffler D, Carr RI, Agnello V, Fiezi T, Kunkel HG (1969) Antibodies to polynucleotides: distribution in human serums. *Science* 166: 1648-1649.
10. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, et al. (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277.
11. Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1725.
12. Naporstek Y, Plotz PH (1993) The Role of Autoantibodies in Autoimmune Disease. *Ann Rev Immunol*. 11: 79-104.
13. Robson MG, Walport MJ (2005) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Allergy* 31: 678-685.
14. Peláez I, Sanin L, Moreno-Montoya J, Goycochea-Robles MV, Madariaga M, Zamudio J, et al. (2011) Epidemiology of the rheumatic Diseases in Mexico. *J Rheumatol* 86: 3-6.
15. Steinberg AD, Melez KA, Raveche, Reeves J, Boegel WA, et al. (1979) Approach to the study of the role of sex hormones in autoimmunity. *Arthritis Rheum* 22: 1170-1176.
16. Chatham WW, Kimberly RP (2001) Treatment of lupus with corticosteroids. *Lupus* 10: 140-147.
17. Doria A, Zen M, Canova M, Bettio S, Bassi N, et al. (2010) SLE diagnosis and treatment: when early is early. *Autoimmun Rev* 10: 55-60.
18. Fernandez-Nebro A, Marsal S, Chatham W, Rahman A (2012) Systemic lupus erythematosus: genomics, mechanisms, and therapies. *Clin Dev Immunol*: 2012: 1-2.
19. Karim MY, Pisoni CN, Khamashta MA (2009) Update on immunotherapy for systemic lupus erythematosus--what's hot and what's not! *Rheumatology (Oxford)* 48: 332-341.
20. Datta SK (1998) Production of pathogenic antibodies: cognate interactions between autoimmune T and B cells. *Lupus* 7: 591-596.
21. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ (1999) A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 189: 1639-1648.
22. Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ (1999) The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 169: 107-121.
23. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P (2002) Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2: 37-45.
24. Tuscano JM, Tedder TF (2003) B lymphocytes contribute to autoimmune disease pathogenesis: current trends and clinical implications. *Autoimmunity Reviews* 2: 101-108.
25. Pritchard NR CA, Uribe S, Chadban SJ, Morley BJ, Smith KG. (2000) Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc receptor FcγRII. *Curr Biol* 10: 227-230.

26. Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, et al. (2002) A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 32: 666-669.
27. Wang SC, Chen YJ, Ou TT, Wu CC, Tsai WC, et al. (2006) Programmed death-1 gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *J Clin Immunol* 26: 506-511.
28. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, et al. (2004) Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 75: 504-507.
29. Leonid Gorelik RAF (2000) Abrogation of TGF β Signaling in T Cells Leads to Spontaneous T Cell Differentiation and Autoimmune Disease. *Immunity* 12: 171-181.
30. Karandikar NJ, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA (1996) CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *JEM* 184: 783-788.
31. Prud'homme GJ, Piccirillo CA (2000) The Inhibitory Effects of Transforming Growth Factor-Beta-1 (TGF- β 1) in Autoimmune Diseases. *J of Autoimmunity* 14: 23-42.
32. Suzuki TK, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, et al. (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268: 1472-1476.
33. Chernysheva AD, Kirou KA, Crow MK (2002) T cell proliferation induced by autologous non-T cells is a response to apoptotic cells processed by dendritic cells. *J Immunol* 169: 1241-1250.
34. Walport MJ (2000) Lupus, DNase and defective disposal of cellular debris. *Nature Genetics* 25: 125-146.
35. Prodeus AP, Shen LM, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, et al. (2000) A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity* 9: 721-731.
36. Aggarwal R, Sestak AL, D'Sousa A, Dillon SP, Namjou B, et al. (2010) Complete complement deficiency in a large cohort of familial systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19: 52-57.
37. Gaip US, Sheriff A, Franz S, Munoz LE, Voll RE, et al. (2006) Inefficient clearance of dying cells and autoreactivity. *Curr Top Microbiol Immunol* 305: 161-176.
38. Martinez Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M (2008) DNase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 7: 359-363.
39. Miyagawa H, Yamai M, Sakaguchi D, Kiyohara C, Tsukamoto H, et al. (2008) Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 47: 158-164.
40. Emlen W, Niebur J, Kadera R (1994) Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 152: 3685-3692.
41. Huggins ML, Todd I, Cavers MA, Pavuluri SR, Tighe PJ, et al. (1999) Antibodies from systemic lupus erythematosus (SLE) sera define differential release of autoantigens from cell lines undergoing apoptosis. *Clin Exp Immunol* 118: 322-328.
42. F Rieux-Laucat FLD, C Hivroz, IA Roberts, KM Debatin, A Fischer and JP de Villartay. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268: 1347-1349.
43. Galen HF, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. (1995) Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81: 935-946.
44. Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, Isenberg DA (2000) Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 59: 243-251.
45. Kirou KA, Crow MK (1999) New pieces to the SLE cytokine puzzle. *Clin Immunol* 91: 1-5.
46. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, et al. (1979) Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* 301: 5-8.
47. Preble OT, Black RJ, Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J (1982) Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 216: 429-431.

48. Ytterberg SR, Schnitzer TJ (1982) Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 401-406.
49. Shi SN, Wen YM, He LF, Huang YX (1987) Serum interferon in systemic lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 117: 155-159.
50. Cepika AM, Soldo Juresa D, Morovic Vergles J, Malenica B, Santak M, et al. (2012) Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine treatment. *Cell Immunol* 276: 196-203.
51. Tsao JT, Hsieh SC, Chiang BL, Yu CL, Lin SC (2012) Altered IL-10 and TNF-alpha production in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus patients after Toll-like receptor 2, 4, or 9 activation. *Clin Exp Med* 12: 153-158.
52. Ronnblom LE, Alm GV, Oberg KE (1990) Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon-alpha treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour. *J Intern Med* 227: 207-210.
53. Wandl UB, Nagel-Hiemke M, May D, Kreuzfelder E, Kloke O, et al. (1992) Lupus-like autoimmune disease induced by interferon therapy for myeloproliferative disorders. *Clin Immunol Immunopathol* 65: 70-74.
54. Vallin H, Alm GV, Cederblad B, Rönblom L. (1999) Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 115: 196-202.
55. Blanco PA, Gill M, Pascual V, Banchereau J (2001) Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 294: 1540-1543.
56. Santiago-Raber ML, Baccala R, Haraldsson KM, Choubey D, Stewart TA, et al. (2003) Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J Exp Med* 197: 777-788.
57. Hron JD PS (2004) Type I IFN protects against murine lupus. *Journal of immunology* 173: 2134-2142.
58. Schwarting PK, Tschirner S, Menke J, Hansen T, et al. (2005) Interferon-beta: a therapeutic for autoimmune lupus in MRL-Faslpr mice. *J Am Soc of Nephrol* 16: 3264-3272.
59. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, et al. (2003) Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197: 711-723.
60. Crow MK (2005) Interferon pathway activation in systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 7: 463-468.
61. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Papagiannis IG, et al. (2004) Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50: 3958-3967.
62. Nikpour M, Dempsey AA, Urowitz MB, Gladman DD, Barnes DA (2008) Association of a gene expression profile from whole blood with disease activity in systemic lupus erythaematosus. *Ann Rheum Dis* 67: 1069-1075.
63. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, et al. (2003) Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2610-2615.
64. Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147: 258-267.
65. Van-Oss CJ (2004) Historical brevium: Viral interference and interferon. *Immunol Invest* 33: 481-482.
66. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE (1987) Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56: 727-777.
67. Diaz MO, Bohlander S, Allen G. (1996) Nomenclature of the human interferon genes. *J Interferon Cytokine Res* 16: 179-180.

68. Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14: 778-809, table of contents.
69. Fensterl VS (2009) Interferons and viral infections. *Biofactors* 35: 14-20.
70. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine-receptor complex. *Nat Immunol* 4: 69-77.
71. Ronnblom L, Ramstedt U, Alm GV (1983) Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. *Eur J Immunol* 13: 471-476.
72. Ihle JN (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature* 377: 591-594.
73. Ihle JN, Kerr IM (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11: 69-74.
74. Schindler C, Plumlee C (2008) Interferons and the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19: 311-318.
75. Hou SX, Zheng Z, Chen X, Perrimon N (2002) The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev Cell* 3: 765-778.
76. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117: 1281-1283.
77. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.
78. Darnell JE, Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635.
79. Quelle FW, Witthuhn BA, Tang B, Cohen S, Ihle JN (1995) Phosphorylation and activation of the DNA binding activity of purified Stat1 by the Janus protein-tyrosine kinases and the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 270: 20775-20780.
80. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.
81. Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U (2000) Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10418-10423.
82. Haspel RL, Darnell JE, Jr. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10188-10193.
83. McBride KM, McDonald C, Reich NC (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J* 19: 6196-6206.
84. Fu XY, Schindler C, Imbrota T, Aebersold R, Darnell JE, Jr. (1992) The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7840-7843.
85. Schindler C, Fu XY, Imbrota T, Aebersold R, Darnell JE, Jr. (1992) Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7836-7839.
86. Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S (1992) A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 70: 313-322.
87. Lenschow DJ, Giannakopoulos NV, Gunn LJ, Johnston C, O'Guin AK, et al. (2005) Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. *J Virol* 79: 13974-13983.
88. Sadler AJ, Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8: 559-568.
89. Rebouillat D, Hovnanian A, Marié I, Hovanessian AG (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* 19: 295-308.
90. De Veer M, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, et al. (2001) Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leuko Biol* 69: 912-920.
91. Loeb KR, Haas AL (1992) The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem* 267: 7806-7813.
92. Malakhova OA, Yan M, Malakhov MP, Yuan Y, Ritchie KJ, et al. (2003) Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev* 17: 455-460.

93. Pichlmair A, Lassnig C, Eberle CA, Gorna MW, Baumann CL, et al. (2011) IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat Immunol* 12: 624-630.
94. Honda K, Taniguchi T (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6: 644-658.
95. Sigurdsson S, Nordmark G, Goring HH, Lindroos K, Wiman AC, et al. (2005) Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 76: 528-537.
96. Leaman DW, Chawla-Sarkar M, Vyas K, Reheman M, Tamai K, et al. (2002) Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277: 28504-28511.
97. Krebs DL, Hilton DJ (2000) SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113 (Pt 16): 2813-2819.
98. Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, et al. (2003) PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278: 21327-21330.
99. You M, Yu DH, Feng GS (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 19: 2416-2424.
100. Starr R, Hilton DJ (1998) SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1081-1085.
101. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, et al. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387: 921-924.
102. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A (2000) Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 18: 143-164.
103. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, et al. (1998) Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 114-119.
104. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, et al. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387: 924-929.
105. Cornish AL, Chong MM, Davey GM, Darwiche R, Nicola NA, et al. (2003) Suppressor of cytokine signaling-1 regulates signaling in response to interleukin-2 and other gamma c-dependent cytokines in peripheral T cells. *J Biol Chem* 278: 22755-22761.
106. Evel-Kabler K, Song XT, Aldrich M, Huang XF, Chen SY (2006) SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling. *J Clin Invest* 116: 90-100.
107. Song MM, Shuai K (1998) The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 273: 35056-35062.
108. Wang Q, Miyakawa Y, Fox N, Kaushansky K (2000) Interferon-alpha directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1. *Blood* 96: 2093-2099.
109. Starr R, Wilson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, et al. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387: 917-921.
110. Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2071-2076.
111. Doti N, Scognamiglio PL, Madonna S, Scarponi C, Ruvo M, et al. (2012) New mimetic peptides of the kinase-inhibitory region (KIR) of SOCS1 through focused peptide libraries. *Biochem J* 443: 231-240.
112. Giordanetto F, Kroemer RT (2003) A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). *Protein Eng* 16: 115-124.
113. Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG (1998) The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 12: 3872-3881.

114. Marine JC, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, et al. (1999) SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 98: 609-616.
115. Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, Brysha M, Willson TA, et al. (1998) Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14395-14399.
116. Hanada T, Kinjyo I, Inagaki-Ohara K, Yoshimura A (2003) Negative regulation of cytokine signaling by CIS/SOCS family proteins and their roles in inflammatory diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 72-86.
117. Hanada T, Yoshida H, Kato S, Tanaka K, Masutani K, et al. (2003) Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity* 19: 437-450.
118. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH (1992) Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35: 630-640.
119. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
120. Csiszár A, Nagy GY, Gergely P, Pozsonyi T, Pócsik É (2000) Increased interferon-gamma (IFN-g), IL-10 and IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 122: 464-470.