



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN FUNCIONAL POR
CÉLULAS T REGULADORAS MEDIADA POR Cbl-b
EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO
GENERALIZADO

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN
MEDICINA INTERNA

PRESENTA:
DR. JORGE RAFAEL ROMO TENA

DIRECTORES DE TESIS:
DR. JORGE CARLOS ALCOCER VARELA*
DRA. DIANA GÓMEZ MARTÍN*
DRA. MARÍA DEL CARMEN CÁRDENAS CORTÉS

***Depto. de Inmunología y Reumatología, INNSZ**



MÉXICO, D.F.,

NOVIEMBRE DE 2014



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.



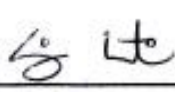
DR. ALFONSO GULÍAS HERRERO

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA INTERNA
SUBDIRECTOR DE SERVICIOS PARAMÉDICOS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



DR. JORGE CARLOS ALCOCER VARELA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



DRA. DIANA GÓMEZ MARTÍN

MÉDICO ADSCRITO DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



DRA. MARÍA DEL CARMEN CÁRDENAS CORTÉS

MÉDICO ADSCRITO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES

DIRECTOR DE ENSEÑANZA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. "SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

Gracias a la vida por permitirme estar aquí y realizar lo que más me apasiona, en este gran Instituto en el que me he formado.

A cada uno de mis tutores por su orientación, atención y apoyo. Al Dr. Jorge Alcocer por la confianza y sus enseñanzas y por permitirme ser parte de su grupo de investigación durante todos estos años. A Diana por tanto apoyo y tantas enseñanzas, por su valiosa amistad, por creer en mí e impulsarme a ser mejor cada día.

A mi familia por brindarme su apoyo en todo momento y ante toda circunstancia y por su paciencia ante todos los sacrificios que la profesión implica. Especialmente a mis padres, Jorge y Ana Elisa, y mis hermanas Ana Elisa, Natalia y Coqui, por siempre estar ahí.

A mis amigos junto a quienes he recorrido este camino y ser los pilares fundamentales de mi residencia médica, especialmente a Ana, Daniel, Diego, Fernanda, Hernando, Lucía, Luis Gerardo, Jorge, Javier, Juan y Sergio.

ÍNDICE

	Página
Resumen Ejecutivo	5
Marco Teórico	6
Planteamiento del Problema	10
Justificación	11
Pregunta de Investigación	12
Hipótesis	12
Objetivo General	12
Material y Métodos	12
Resultados	15
Discusión	17
Referencias Bibliográficas	20

Resumen ejecutivo

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune caracterizada por alteraciones en los mecanismos de tolerancia periférica. Se desconoce si existen alteraciones en los mecanismos de regulación funcional de células T reguladoras mediada por la ligasa de ubiquitina Cbl-b asociadas a la resistencia de células T efectoras a la supresión por células T reguladoras en pacientes con LEG. El objetivo del presente trabajo es evaluar la expresión de la proteína Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG, así como su efecto en términos funcionales sobre la supresión de células T efectoras. Se estudiaron 17 pacientes de 18 a 45 años con LEG, en remisión o activos, así como controles sanos pareados por edad y sexo. Se obtuvieron células T efectoras y reguladoras de sangre periférica y se estudiaron en co-cultivos 1:1 tanto autólogos como alogénicos. Se evaluó la respuesta proliferativa mediante citometría de flujo. Asimismo, se determinó la expresión de la proteína de Cbl-b mediante Western Blot. Se demostró la presencia de resistencia a la supresión por células T reguladoras en pacientes con LEG, lo cual se asoció al defecto en la expresión de Cbl-b y del regulador del ciclo celular p27kip1 en las células T reguladoras de los pacientes con LEG en comparación con controles sanos. Estos defectos pueden ser considerados intrínsecos, puesto que se presentan tanto en pacientes con enfermedad activa, como en aquellos en remisión.

Marco Teórico

El sistema inmune ha desarrollado múltiples mecanismos de tolerancia periférica, los cuales están encaminados a contender contra las diversas células T y B autoreactivas que logran escapar a los mecanismos de tolerancia central que se llevan a cabo dentro del timo [1], con el objetivo de evitar el desarrollo de patología autoinmune. Dentro de estos mecanismos, se encuentran la anergia[2], y el efecto supresor mediado a través de células T reguladoras (Tregs)[3, 4], entre otros.

Las células T reguladoras en humanos se caracterizan por la expresión de diversas moléculas, dentro de las cuales se destacan la cadena α del receptor de IL-2 (CD25), así como el factor de transcripción FOXP3 (Forkhead box P3) y la ausencia o baja expresión de CD127 (receptor de IL-7) [5]. Esta subpoblación celular se considera indispensable para el mantenimiento de la tolerancia periférica y la homeostasis del sistema inmune.

Las células T reguladoras pueden dividirse en naturales, es decir provenientes del timo e inducibles[6], que pueden distinguirse con base en sus funciones y características fenotípicas. Desde el punto de vista funcional, las células T reguladoras se caracterizan por la capacidad de ejercer un efecto supresor tanto de la proliferación como de la respuesta efectora de diversas subpoblaciones celulares, tales como linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, y células NK[7, 8].

Las células T reguladoras ejercen su efecto supresor a través de diversos mecanismos, que incluyen la producción de citocinas supresoras, (i.e. IL-10[9], IL-35[10] y TGF- β [11]); citólisis mediada por granzimas[12]; alteraciones metabólicas como muerte por privación de citocinas y mediadores bioquímicos como la

adenosina[13]; e inhibición de la maduración y función de células dendríticas[14]. Asimismo, se ha demostrado el requerimiento de la expresión de FOXP3 en células T reguladoras para su función supresora tanto *in vitro* como *in vivo* [15-17].

Las alteraciones tanto cuantitativas como funcionales de la subpoblación de células T reguladoras se han asociado al desarrollo y/o mantenimiento de diversas patologías autoinmunes, tanto órgano específicas como sistémicas, en modelos murinos y en humanos[6, 18-24].

La ruptura de los mecanismos de tolerancia periférica se asocia al desarrollo y mantenimiento de patología autoinmune, por lo que su regulación es de gran relevancia para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune.

Los mecanismos de tolerancia periférica, como la inducción de anergia y la función de las células T reguladoras, pueden ser modulados por el sistema de ubiquitinación [25]. Este sistema comprende la conjugación de ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada, a un sustrato protéico, y es en sí un mecanismo de modificación postraduccional de alta especificidad, que puede ser dependiente e independiente de proteólisis.

El mecanismo de conjugación ubiquitina-proteína implica una secuencia de reacciones enzimáticas, que involucran tres diferentes tipos de enzimas: E1 (activadora), enzima conjugadora (E2) y, finalmente una ligasa de ubiquitina (E3) la cual transfiere la ubiquitina activada a un residuo de lisina en la proteína blanco, siendo este último paso el que brinda la especificidad al sistema [26, 27].

Recientemente se ha destacado el papel de ligasas de ubiquitina (E3), tales como Cbl-b (Casitas B lymphoma), GRAIL (Gene Related to Anergy in Lymphocytes) e Itch, cuyos genes forman parte del programa inducido por calcio/calcineurina [28-30].

La expresión de Cbl-b induce anergia al producir una disminución en la fosforilación de la fosfolipasa C γ -1 (PLC γ -1). Lo anterior altera las vías de señalización dependientes de calcio [31] y la formación de una sinapsis inmunológica efectiva [32, 33].

Asimismo, Cbl-b funciona como regulador negativo de la fosforilación de Vav 1, acoplando la proliferación y la producción de IL-2 a la presencia de coestimulación a través de CD28. Recientemente se ha descrito que Cbl-b es capaz de modular la función de la cadena ζ del receptor de células T (TCR) mediante la poliubiquitinación K-33, lo cual se asocia a inhibición de la fosforilación y su asociación con ZAP-70, mediante lo cual se bloquea la señalización a través del TCR[34]. Recientemente se ha reportado que la actividad catalítica de ligasa de ubiquitina de Cbl-b es esencial para la regulación de la funcionalidad en linfocitos T [35].

La ausencia de Cbl-b, como se observa en el ratón Cbl-b ^{-/-}, se asocia al desarrollo de autoinmunidad espontánea e inmunopatología inducida por un reto antigénico [36, 37].

El lupus eritematoso generalizado [38] es una enfermedad autoinmune crónica, que se considera el prototipo de las enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado que los pacientes con LEG tienen defectos en los mecanismos de tolerancia periférica [39, 40].

Sin embargo, éstos no se han delineado con precisión. Existe evidencia que indica que las células T de los pacientes con LEG tienen un comportamiento anormal.

Las células T de los pacientes con LEG tienen defectos claros en los mecanismos de activación. Muestran evidencia que indica un estado parcial de activación, pero no se activan en forma óptima si son estimuladas in vitro [41].

Por ejemplo, se han mostrado defectos en la expresión de la cadena ζ del complejo TCR/CD3, así como un franco defecto en la producción de IL-2; conllevan un incremento en la fosforilación de cinasas de tirosina y en la producción de 1,4,5-inositol trifosfato. Lo anterior resulta en mayor liberación de calcio intracelular y el predominio de vías de señalización que se asocian a la expresión y translocación nuclear de NF-AT [39, 42, 43].

Aunado a lo anterior, tanto en modelos murinos de LEG como en humanos con la enfermedad, se ha demostrado que las células T CD4⁺ son resistentes a la inducción de anergia [44] , lo cual se relaciona con un defecto en la fosforilación de Cbl-b y la expresión continua de ERK (extracellular signal-regulated kinase) fosforilada [45].

En experimentos realizados en nuestro laboratorio se ha documentado disminución en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b, tanto a nivel del RNAm como de la proteína en células T CD4⁺ de pacientes con LEG, lo cual se asoció con un fenotipo de resistencia a anergia, independientemente de la actividad de la enfermedad, lo cual sugiere que forma parte de los defectos intrínsecos en LEG.

Así mismo, nuestro grupo y otros han demostrado la presencia de resistencia a la supresión por células T reguladoras en pacientes con LEG, independientemente de la actividad de la enfermedad[46, 47], y de la ausencia o presencia de linfopenia[48]

Aunado a lo anterior, en el modelo murino Cbl-b^{-/-} se ha demostrado que la deficiencia de esta ligasa de ubiquitina se asocia a la resistencia de las células T efectoras (CD4⁺CD25⁻) al efecto supresor por las células T reguladoras. Específicamente se ha demostrado que esta resistencia se presenta en un contexto dependiente de TGF- β tanto *in vitro* como *in vivo* [49-51], lo cual a su vez se asoció con un defecto en la fosforilación de Smad2.

La resistencia de las células efectoras al efecto supresor de las T reguladoras puede constituir un mecanismo por el cual se perpetúe la proliferación aberrante de células T autorreactivas, por lo que podría considerarse dentro del esquema fisiopatogénico de patologías autoinmunes, tales como LEG. Los mecanismos moleculares involucrados, específicamente la regulación de la función de T reguladoras mediada por la ligasa de ubiquitina Cbl-b no ha sido evaluada en pacientes con LEG, lo cual constituye el objetivo del presente proyecto.

Planteamiento del Problema

El LEG es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por diversas alteraciones en los mecanismos de tolerancia periférica. Se han descrito múltiples defectos en los mecanismos de activación de linfocitos T, así como alteraciones cuantitativas y funcionales tanto de células T efectoras como reguladoras. Se desconoce a detalle cuáles son los defectos que subyacen a dichas alteraciones funcionales. Específicamente, se desconoce si existen alteraciones en los mecanismos de regulación funcional de células T reguladoras mediada por ligasas de ubiquitina asociadas a la resistencia de las células T efectoras a la supresión por T reguladoras en pacientes con LEG.

Debido a la asociación entre defectos en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b y la resistencia al efecto supresor por T reguladoras, se propone que la alteración en la regulación funcional mediada por dicha ligasa de ubiquitina puede tener un papel fisiopatogénico en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso generalizado.

Justificación

El lupus eritematoso generalizado es considerado el prototipo de las enfermedades autoinmunes, por lo que su estudio es de gran relevancia para el conocimiento de la fisiopatogenia de este grupo de enfermedades, cuyo impacto en morbilidad y mortalidad ha sido ampliamente reconocido.

Por su parte, también es importante resaltar que recientemente se ha demostrado que la prevalencia en población catalogada como “hispana” es mayor a la reportada para otros grupos étnicos, llegando a ser de aproximadamente 94 casos por 100 000 individuos [52], mientras que en Estados Unidos se han reportado tasas entre 14.6 y 50.8 por 100 000 individuos [53].

Desde el punto de vista fisiopatogénico, la resistencia al efecto supresor por T reguladoras confiere un mecanismo de evasión mediante el cual las células T efectoras autoreactivas son capaces de mantener una respuesta proliferativa y efectora aberrante, especialmente en un microambiente inflamatorio. Lo anterior se asocia con la inducción y mantenimiento de autoinmunidad en enfermedades tales como el LEG. El conocimiento de los mecanismos de regulación funcional de las células T reguladoras mediados por ubiquitinación es de gran relevancia para ampliar el modelo fisiopatogénico de la enfermedad.

Pregunta de Investigación

¿Cuáles son las alteraciones en los mecanismos de regulación funcional de células T reguladoras mediados por la ligasa de ubiquitina Cbl-b, que se asocian a la resistencia al efecto supresor por T reguladoras en pacientes con LEG?

Hipótesis

Existe disminución en la expresión de la proteína Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG, en comparación con células T de sujetos normales, lo que confiere resistencia al efecto supresor en pacientes con LEG.

Objetivo General

Evaluar la expresión de la proteína Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG, así como su efecto en términos funcionales sobre la supresión de células T efectoras.

Material y Métodos

Pacientes y Controles. Se estudiaron 17 pacientes mayores de 18 años, con LEG diagnosticado en base a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología [54] provenientes del servicio de consulta externa de reumatología y hospitalización del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Se obtuvo información clínica relevante a partir de su expediente. Se registró la actividad de su enfermedad el día de la toma de la muestra de acuerdo al índice MEX-SLEDAI [55].

Criterios de Inclusión

Pacientes:

- Pacientes de 18 a 45 años de edad con diagnóstico de LEG según los criterios del Colegio Americano de Reumatología, que se encuentren en remisión (SLEDAI 0) ó activos (SLEDAI \geq 6).
- Sin antecedente de tratamiento con corticoesteroides e inmunosupresores en los 12 meses previos a la toma de muestra para pacientes en remisión y 1 mes para pacientes activos.
- Aceptación voluntaria de ingreso al estudio (consentimiento informado).

Controles:

- Individuos sanos de 18 a 45 años de edad.
- Sin antecedentes heredo familiares de LEG.

Criterios de Exclusión

- Diagnóstico de embarazo.
- Diagnóstico de patologías que pueden alterar el número de células T reguladoras, tales como diabetes mellitus, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide.
- Diagnóstico de infecciones virales crónicas.

La participación de los pacientes y controles fue voluntaria; cada individuo firmó una hoja de consentimiento informado.

Cálculo del tamaño de la muestra

Se realizó tomando en cuenta la media y DE de la proteína Cbl-b en pacientes células T CD4⁺ de pacientes con LEG bajo condiciones de activación, con una significancia a dos colas del 5% y un poder del 95%, con una delta de 0.35.

$$N = 2K\delta^2/\Delta^2$$

$$N = 2.038/0.1225 = 16.7 = 17 \text{ sujetos por grupo}$$

Obtención de células efectoras y reguladoras. Los experimentos se realizaron con células T CD4⁺ obtenidas de sangre periférica. A cada sujeto se le extrajeron 60 mL de sangre venosa periférica que fue anticoagulada con heparina. Se separaron las células mononucleares por centrifugación a través de gradientes de densidad (Ficoll-Hypaque). Las células CD4⁺ se obtuvieron por medio de selección negativa mediante microesferas magnéticas (pureza mayor a 95%). Posteriormente para la obtención de células T reguladoras se seleccionaron de esta población aquellas CD25⁺ mediante selección positiva con microesferas magnéticas (pureza 90%).

Expresión de la proteína Cbl-b. Se obtuvieron lisados totales de las células T reguladoras purificadas. Se realizó WB para Cbl-b y se normalizó con β -actina.

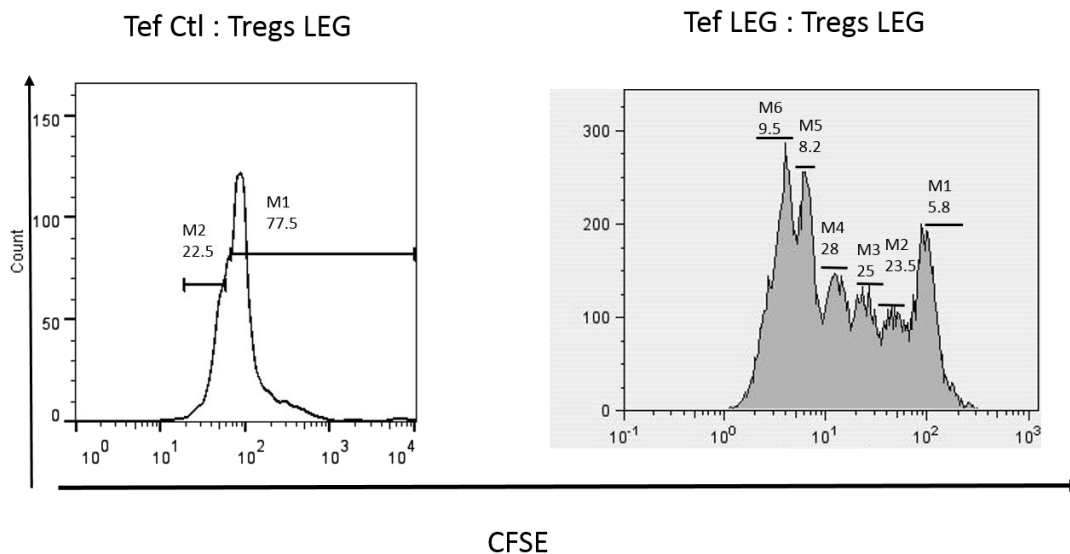
Ensayos de Proliferación: Se realizaron co-cultivos 1:1 autólogos y alogénicos T efectoras y T reguladoras, las cuales previamente fueron teñidas con CFSE. Posteriormente se sembraron por duplicado en placas de 24 pozos y se agregó anti-CD3 y anti-CD28, así como IL-2. Se mantuvieron en cultivo por 72 horas y posteriormente se cosecharon. Se lavaron y fijaron con paraformaldehído para su lectura mediante citometría de flujo. Los datos se analizaron mediante el software flow-Jo para la evaluación de respuesta proliferativa por subpoblaciones.

Análisis Estadístico. Los resultados fueron expresados en términos de media y desviación estándar o mediana e intervalo intercuartilar, dependiendo de la distribución de la muestra. Se realizó la comparación entre grupos por variable desenlace mediante t de Student, ANOVA, U Mann Whitney o Kruskal Wallis según fue conveniente. Se consideró como significancia estadística una $p < 0.05$. El análisis se realizó con apoyo del programa estadístico SPSS para Windows versión 16.0.

Resultados

Se reclutaron 17 pacientes y 17 controles sanos ajustados por edad y sexo. De los 17 pacientes incluidos, 12 fueron pacientes con LEG activo sin tratamiento inmunosupresor. El índice de actividad promedio (SLEDAI) para los pacientes activos fue de 20.8 puntos.

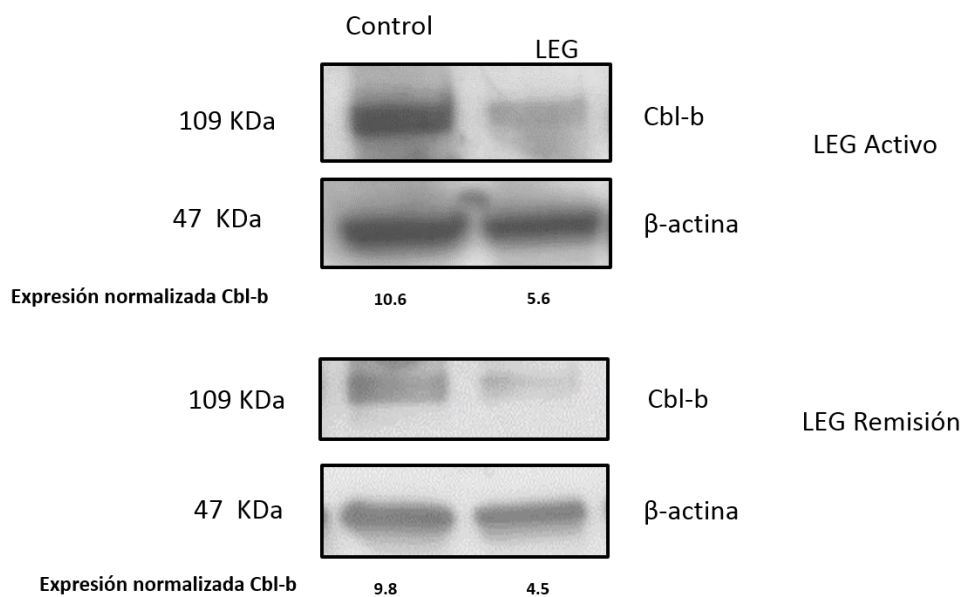
En los co-cultivos autólogos, se demostró que las células T efectoras ($CD4^+CD25^-$) de los pacientes con LEG mostraron incremento en el índice de proliferación, mientras que en los co-cultivos alogénicos las células T efectoras ($CD4^+CD25^-$) de los controles sanos mostraron una adecuada supresión (disminución en la proliferación) por las células T reguladoras de los sujetos con LEG. Por lo tanto, en pacientes con LEG se demostró la presencia de resistencia a la supresión por células T reguladoras ($CD4^+CD25^+CD127^-$) en comparación con controles sanos.



Resistencia de las T efectoras al efecto supresor de las T reguladoras en LEG

Esta resistencia a la supresión por células T reguladoras se asoció a un defecto en la expresión de Cbl-b (5.82 ± 1.02 vs 10.85 ± 1.76 , $p=0.021$) en comparación con los controles sanos.

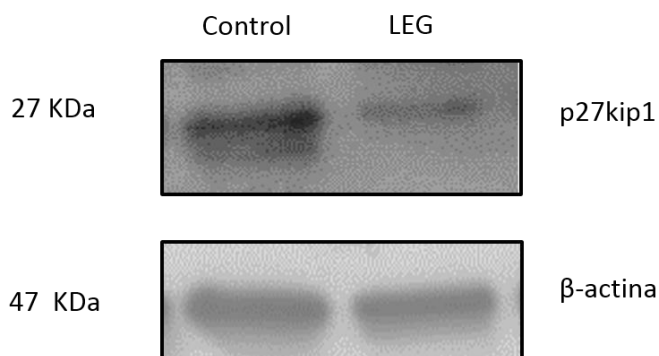
Expresión de Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG



No se encontraron diferencias significativas entre aquellos pacientes que se encontraban en remisión y aquellos con enfermedad activa.

Así mismo, se documentó una tendencia a la disminución en la expresión del regulador del ciclo celular p27kip1 en las células T reguladoras de los pacientes con LEG en comparación con controles sanos.

Expresión de p27kip1 en células T reguladoras de pacientes con LEG



Discusión

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que en los pacientes con LEG se demostró la presencia de resistencia a la supresión por células T reguladoras en términos de la respuesta proliferativa, lo cual se asoció al defecto en la expresión de Cbl-b y a una tendencia a la disminución en la expresión de p27kip1 en las células T reguladoras de los pacientes con LEG en comparación con controles sanos. Estos defectos pueden ser considerados intrínsecos, puesto que se presentan tanto en pacientes con enfermedad activa, como en aquellos en remisión.

Nuestros hallazgos concuerdan con lo previamente reportado sobre el fenómeno de resistencia a la supresión por células T reguladoras en pacientes con LEG [46, 47]. Dicho fenómeno se ha documentado en ratones deficientes de Cbl-b, que muestran patología similar a LEG[50], y se presenta en un contexto dependiente de TGF- β .

El defecto en la expresión de Cbl-b en la población de células T efectoras en pacientes con LEG y su asociación con el fenómeno de resistencia a anergia, así como con múltiples defectos en la señalización a través del receptor de células T, ha sido demostrado previamente por nuestro grupo de investigación[57].

Así mismo, se ha documentado que la deficiencia de p27kip1 en células T reguladoras se asocia al desarrollo de patología autoinmune en modelos murinos (artritis inducida por colágeno y LEG)[58]. Nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado previamente y denotan el papel del regulador del ciclo celular p27kip1 como una molécula clave para la regulación de los mecanismos de tolerancia periférica, tales como la anergia y la supresión por células T reguladoras.

En resumen, las células T efectoras de los pacientes con LEG muestran resistencia a la supresión por células reguladoras, lo cual está asociado a un defecto en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b y del regulador del ciclo celular p27kip1. Dicho defecto puede ser considerado como intrínseco, ya que no depende de la actividad de la enfermedad. Lo anterior sugiere que la regulación del ciclo celular, específicamente el paso de la fase G1 a S, es un evento clave para la modulación de la tolerancia periférica tanto en células T efectoras como en células T reguladoras. Nuestros hallazgos sugieren que p27kip1 puede ser regulado por el sistema de ubiquitinación, lo cual se encuentra bajo estudio por nuestro grupo de investigación.

El presente trabajo constituye la base para el estudio del papel de Cbl-b en la modulación funcional de células T reguladoras en pacientes con LEG. Se plantea evaluar en posteriores trabajos la resistencia a la supresión por células T reguladoras en células T efectoras de pacientes con LEG, en términos de la respuesta efectora (producción de citocinas y expresión de marcadores de activación) y la funcionalidad de Cbl-b en la regulación de la supresión por T reguladoras mediada por TGF- β mediante el análisis del perfil de fosforilación y ubiquitinación de las moléculas Smad, así como las consecuencias funcionales (respuesta efectora y supresora) de la sobre-expresión e inhibición de la expresión de Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG y controles sanos.

Referencias Bibliográficas

1. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2010; **11**:21-7.
2. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**:305-34.
3. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**:490-500.
4. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; **11**:7-13.
5. de St Groth BF, Zhu E, Asad S, Lee L. Flow Cytometric Detection of Human Regulatory T Cells. *Methods Mol Biol* 2011; **707**:263-79.
6. Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 2011.
7. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; **193**:1285-94.
8. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001; **193**:1295-302.
9. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR, Jr., Muller W, Rudensky AY. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008; **28**:546-58.
10. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; **450**:566-9.
11. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; **194**:629-44.
12. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004; **104**:2840-8.
13. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3⁺ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 2007; **179**:3578-87.
14. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2006; **203**:505-11.
15. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3(+) regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**:119-30.
16. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2004; **6**:745-51.
17. Jang E, Cho WS, Cho ML, Park HJ, Oh HJ, Kang SM, Paik DJ, Youn J. Foxp3⁺ regulatory T cells control humoral autoimmunity by suppressing the development of long-lived plasma cells. *J Immunol* 2011; **186**:1546-53.

18. Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4+ regulatory cells as a potential immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; **360**:1647-61.
19. Hobeika AC, Morse MA, Osada T, Peplinski S, Lysterly HK, Clay TM. Depletion of human regulatory T cells. *Methods Mol Biol* 2011; **707**:219-31.
20. Kahaly GJ, Shimony O, Gellman YN, Lytton SD, Eshkar-Sebban L, Rosenblum N, Refaeli E, Kassem S, Ilany J, Naor D. Regulatory T-cells in graves' orbitopathy: baseline findings and immunomodulation by anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**:422-9.
21. Kollins D, Stoelcker B, Hoffmann U, Bergler T, Reinhold S, Banas MC, Rummele P, Farkas S, Kramer BK, Banas B. FOXP3+ regulatory T-cells in renal allografts: correlation with long-term graft function and acute rejection. *Clin Nephrol* 2011; **75**:91-100.
22. Koyabu M, Uchida K, Miyoshi H, Sakaguchi Y, Fukui T, Ikeda H, Takaoka M, Hirohara J, Nishio A, Uemura Y, Uemoto S, Okazaki K. Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases. *J Gastroenterol* 2010; **45**:732-41.
23. La Scaleia R, Morrone S, Stoppacciaro A, Scarpino S, Antonelli M, Bianchi E, Di Nardo G, Oliva S, Viola F, Cucchiara S, Santoni A, Palmieri G, Uccini S. Peripheral and intestinal CD4+ T cells with a regulatory phenotype in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; **51**:563-72.
24. Lourenco EV, La Cava A. Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity* 2011; **44**:33-42.
25. Gomez-Martin D, Diaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J. Ubiquitination system and autoimmunity: the bridge towards the modulation of the immune response. *Autoimmun Rev* 2008; **7**:284-90.
26. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000; **22**:442-51.
27. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; **70**:503-33.
28. Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 2002; **109**:719-31.
29. Liu YC. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**:81-127.
30. Heissmeyer V, Macian F, Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K, Gu H, Liu YC, Dustin ML, Rao A. Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nature immunology* 2004; **5**:255-65.
31. Jeon MS, Atfield A, Venuprasad K, Krawczyk C, Sarao R, Elly C, Yang C, Arya S, Bachmaier K, Su L, Bouchard D, Jones R, Gronski M, Ohashi P, Wada T, Bloom D, Fathman CG, Liu YC, Penninger JM. Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity* 2004; **21**:167-77.
32. Wells AD, Liu QH, Hondowicz B, Zhang J, Turka LA, Freedman BD. Regulation of T cell activation and tolerance by phospholipase C gamma-1-dependent integrin avidity modulation. *J Immunol* 2003; **170**:4127-33.
33. Naramura M, Jang IK, Kole H, Huang F, Haines D, Gu H. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nature immunology* 2002; **3**:1192-9.

34. Huang H, Jeon MS, Liao L, Yang C, Elly C, Yates JR, 3rd, Liu YC. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity* 2010; **33**:60-70.
35. Paolino M, Thien CB, Gruber T, Hinterleitner R, Baier G, Langdon WY, Penninger JM. Essential Role of E3 Ubiquitin Ligase Activity in Cbl-b-Regulated T Cell Functions. *J Immunol* 2011; **186**:2138-47.
36. Bachmaier K, Krawczyk C, Kozieradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A, Mariathasan S, Bouchard D, Wakeham A, Itie A, Le J, Ohashi PS, Sarosi I, Nishina H, Lipkowitz S, Penninger JM. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 2000; **403**:211-6.
37. Chiang YJ, Kole HK, Brown K, Naramura M, Fukuhara S, Hu RJ, Jang IK, Gutkind JS, Shevach E, Gu H. Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* 2000; **403**:216-20.
38. Bottomley MJ, Stier, G.,Pennacchini, D.,Legube, G.,Simon, B.,Akhtar, A.,Sattler, M.,Musco, G. NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* 2005; **280**:11505-12.
39. Tsokos GC, Liossis SN. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today* 1999; **20**:119-24.
40. Tsokos GC, Mitchell JP, Juang YT. T cell abnormalities in human and mouse lupus: intrinsic and extrinsic. *Curr Opin Rheumatol* 2003; **15**:542-7.
41. Tsokos GC, Wong HK, Enyedy EJ, Nambiar MP. Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 2000; **12**:355-63.
42. Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1982; **69**:1388-92.
43. Kammer GM. Altered regulation of IL-2 production in systemic lupus erythematosus: an evolving paradigm. *J Clin Invest* 2005; **115**:836-40.
44. Bouzahzah F, Jung S, Craft J. CD4+ T cells from lupus-prone mice avoid antigen-specific tolerance induction in vivo. *J Immunol* 2003; **170**:741-8.
45. Yi Y, McNerney M, Datta SK. Regulatory defects in Cbl and mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-related kinase) pathways cause persistent hyperexpression of CD40 ligand in human lupus T cells. *J Immunol* 2000; **165**:6627-34.
46. Vargas-Rojas MI, Crispin JC, Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* 2008; **17**:289-94.
47. Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, Max R, Eckstein V, Blank N, Fiehn C, Ho AD, Lorenz HM. Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; **58**:2120-30.
48. Gomez-Martin D, Diaz-Zamudio M, Vanoye G, Crispin JC, Alcocer-Varela J. Quantitative and functional profiles of CD4(+) lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 2011.

49. Adams CO, Housley WJ, Bhowmick S, Cone RE, Rajan TV, Forouhar F, Clark RB. Cbl-b(-/-) T cells demonstrate in vivo resistance to regulatory T cells but a context-dependent resistance to TGF-beta. *J Immunol* 2010; **185**:2051-8.
50. Wohlfert EA, Callahan MK, Clark RB. Resistance to CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b-/- mice. *J Immunol* 2004; **173**:1059-65.
51. Wohlfert EA, Gorelik L, Mittler R, Flavell RA, Clark RB. Cutting edge: deficiency in the E3 ubiquitin ligase Cbl-b results in a multifunctional defect in T cell TGF-beta sensitivity in vitro and in vivo. *J Immunol* 2006; **176**:1316-20.
52. Walsh BT, Pope C, Reid M, Gall EP, Yocum DE, Clark LC. SLE in a United States-Mexico Border Community. *J Clin Rheumatol* 2001; **7**:3-9.
53. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006; **15**:308-18.
54. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; **25**:1271-7.
55. Guzman J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sanchez-Guerrero J, Alarcon-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992; **19**:1551-8.
56. Crispin J, Vargas-Rojas M, Alcocer-Varela J. Cell Proliferation Index. A reliable and validated method that quantifies cell proliferation according to CFSE dilution. *Clin Immunol* 2005; **115 (suppl 1)**:S267.
57. Gomez-Martin D, Ibarra-Sanchez M, Romo-Tena J, Cruz-Ruiz J, Esparza-Lopez J, Galindo-Campos M, Diaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J. Casitas B lineage lymphoma b is a key regulator of peripheral tolerance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 2013, **65**(4):1032-1042.
58. Iglesias M, Postigo J, Santiuste I, Gonzalez J, Buelta L, Tamayo E, Merino J, Merino R: p27(Kip1) inhibits systemic autoimmunity through the control of Treg cell activity and differentiation. *Arthritis and rheumatism* 2013, **65**(2):343-354.