



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Programa de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

***“ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DEL RECEPTOR DE INTERLEUCINA-7
MEDIADA POR UBICUITINACIÓN EN CELULAS T DE PACIENTES CON
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO Y LINFOPENIA”***

***“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE IL-7 EN PACIENTES CON
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO EN
SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD4”***

**TESIS DE POSGRADO
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER MERAYO CHALICO

TUTORA

DRA. DIANA GÓMEZ MARTÍN

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2017



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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

DRA. DIANA GÓMEZ MARTÍN

INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS D

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS

INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS F

DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Índice

Marco Teórico	3
• Interleucina-7 y Receptor de Interleucina-7	3
• Linfopenia y Mecanismos Compensadores	5
• Linfopenia y autoinmunidad	6
• Linfopenia en lupus eritematoso generalizado	6
• Lupus eritematoso generalizado e Interleucina-7	8
Planteamiento del problema y Justificación	9
Material y Métodos	10
Resultados	12
Discusión	13
Tablas y Gráficas	17
Referencias	23
Apéndices	28

Marco Teórico

1) Interleucina-7 y Receptor de Interleucina-7

La Interleucina-7 (IL-7) es una citocina con características hematopoyéticas, que se agrupan dentro de la subfamilia de citocinas conocidas como “gama común” (γ c). Este grupo de citocinas, como su nombre lo indica, comparten la cadena γ en su receptor membranal (CD132), el cual es común para otras citocinas como IL-2, IL-4, IL-15 e IL-21. En el caso específico del Receptor de IL-7 (IL-7r), a nivel de membrana celular, además de compartir la cadena γ , la especificidad a este nivel, está proporcionada por la cadena alfa (IL-7R α o CD127), la cual tiene un peso molecular de 76Kd, y el heterodímero de aproximadamente 90Kd^{1,2}.

La IL-7 tiene diferentes fuentes de producción, siendo principalmente las células estromales las que en mayor porcentaje participan en la generación de esta citocina³, pero también se ha descrito su producción en diversos tejidos como son intestino, hígado, piel, ovarios, cerebro e incluso en próstata⁴. Esta citocina tiene como principal acción la diferenciación específica de linfocitos inmaduros, así como el desarrollo y mantenimiento de órganos linfoides secundarios. Particularmente, al actuar como un factor de crecimiento, siendo considerada la citocina clave a nivel de circulación periférica⁵, para la supervivencia celular, de diversas subpoblaciones de linfocitos T, siendo sin duda, las más dependientes los linfocitos T vírgenes y de memoria⁶. Específicamente, los linfocitos T CD4 de memoria, los cuales expresan elevadas cantidades de IL-7r^{7,8}. Por el otro lado, es importante mencionar, que las células T reguladoras, muestran característicamente un fenotipo CD4+CD25+Foxp3+CD127^{bajo}, lo cual deja de manifiesto, que la IL-7, parece tener un papel contrario en la regulación de estas células, las cuales son importantes para regular la tolerancia periférica y evitar el desarrollo de patología autoinmune⁹.

Los mecanismos mediante los cuales actúa la IL-7 al unirse con su receptor, son principalmente asociados a la activación de cinasas de tirosina tipo Janus (JAK cinasas), las cuales se encuentran acopladas al heterodímero del IL-7R en su porción intracitoplasmática. Cuando estas cinasas se activan por el ligando (IL-7), se fosforilan y esto a su vez, genera la fosforilación de STAT5, promoviendo a nivel nuclear, la síntesis de proteínas con características anti-apoptóticas (principalmente Mcl-2, Bcl-2) y disminuyendo las de carácter proapoptótico (SOCS3, PD-1), lo cual, promueve la supervivencia celular¹⁰⁻¹². Es importante mencionar, que la interacción IL-7 con su receptor, también actúa a nivel de la vía de PI3k/Akt¹², las cuales parecen estar encargadas principalmente de la vía de desarrollo (a nivel de p27-kip1¹³) y metabolismo celular (aumentando la síntesis del transportador de glucosa Glut-1), pero siendo estas dos funciones menos vitales para la supervivencia celular, por lo que la vía Jak/STAT es considerada como la principal implicada en este proceso.

Se ha demostrado en diversos modelos murinos, que la deficiencia de IL-7 o de su receptor, se encuentra asociada con la presencia de bajas cuentas de linfocitos¹⁴. Así mismo, se ha reportado que los ratones con inactivación de la cadena γ c, y los humanos con mutaciones a este nivel, presentan defectos graves en la maduración de los linfocitos^{15,16}. En el estudio previamente citado, se observó

en modelos murinos que al encontrarse en un ambiente únicamente de linfopenia no existía desarrollo de enfermedad autoinmune, pero una vez que se agregó al modelo IL-7, se provocó una profunda expansión de clonas autoreactivas¹⁶. Lo anterior, se ha visto replicado en otros estudios, con otras citocinas que comparten el receptor, como IL-2¹⁷

Los mecanismos de regulación de la expresión del IL-7r, no se conocen por completo, pero, como es lógico, el principal estímulo para la expresión membranal son los niveles circulantes de IL-7; así mismo, al funcionar esta citocina como un factor de supervivencia celular, este receptor suele regularse mediante el proceso de internalización, reciclaje y reuso (vía endosomal), siendo diversas clatrininas y efrinas, las proteínas claves para este procesamiento^{18, 19}. Este reciclaje a nivel de membrana es dependiente principalmente de la PI3K clase III, Vps34, la cual se encuentra implicada en el mecanismo de autofagia²⁰, mediante la fosforilación de fosfatidil-inositol, generando el reclutamiento de proteínas de internalización (como son FYVE y GLUE)²¹; de hecho, ratones mutados para Vps34 presentan números bajos de células T tanto a nivel periférico como en timo^{14, 22}. Así mismo se ha observado que células vírgenes deficientes en Vps34, evitan el adecuado reciclaje del IL-7r, provocando así que este grupo celular sea susceptible de recibir señales de supervivencia a través del ligando IL-7²³.

Se ha descrito a nivel de células T CD8+, una regulación a la baja en la expresión de la cadena alfa del IL-7r vía metilación del promotor del gen encargado de la síntesis de este receptor²⁴. La ubiquitinación es un mecanismo de modificación postraduccional, mediante el cual una o varias moléculas de ubiquitina se conjugan a un sustrato proteico y lo marcan para su degradación por vía proteosoma. Por lo anterior, esta MPT podría jugar un papel en la regulación del IL-7r, sin embargo, es algo que no ha sido evaluado previamente.²⁵

2) Linfopenia y Mecanismos Compensadores

La linfopenia se puede presentar por múltiples causas, por ejemplo, una de las más frecuentes, infecciones virales, las cuales generan una disminución significativa en el conteo celular de linfocitos T y disparan un mecanismo contra regulador a este estado linfopénico, que tiene como fin, el restablecimiento de las cifras linfocitarias normales²⁶.

Este mecanismo homeostático es conocido como Proliferación Inducida por Linfopenia (LIP por sus siglas en inglés). En dicho mecanismo, cuando se presenta el estado de linfopenia, se producen niveles elevados de citocinas que tienen como función principal mantener la supervivencia celular (como ya se mencionó, principalmente IL-7 y en menor medida IL-15), provocando la expansión celular de linfocitos T²⁷, mediante la inducción de la expresión de moléculas anti-apoptóticas¹¹. Esta LIP, en ausencia de un contexto de clonas autoreactivas, no generará patología autoinmune. El nexo entre la linfopenia y la autoinmunidad, parece ser la presencia de estados linfopénicos crónicos o persistentes, los cuales favorecen que en cada proceso de LIP, se seleccionen cada vez más frecuentemente clonas autoreactivas, que terminarán siendo un mecanismo adicional para el inicio de una patología autoinmune^{28, 29}.

Aún con lo anteriormente mencionado con relación a la LIP, se sabe hoy en día, que la linfopenia *per se*, no es suficiente para provocar patología autoinmune, al parecer se requieren de otros fenómenos adicionales para que exista enfermedad, que, desafortunadamente al momento no se conocen en la mayoría de los casos. En este respecto, la teoría más apoyada con relación a linfopenia y el desarrollo de patología autoinmune, es la publicada por Krupica³⁰, la cual se basa en el “doble golpe”, y sugiere que en presencia de linfopenia (“primer golpe”), los mecanismos que generalmente funcionan para mantener la tolerancia inmunológica del huésped (ausencia de clonas autoreactivas), se encuentran temporalmente disfuncionales. Lo anterior provoca una proliferación de células T periféricas que, junto con una señal adicional (“segundo golpe”), generará una respuesta patológica autoinmune. Como ejemplo, el TGF- β es una citocina básica para evitar la presencia de autoreactividad durante el proceso de LIP; si en condiciones de linfopenia crónica (donde es más probable que existan clonas autoreactivas), estas células tienen perdida su capacidad para responder a TGF- β , esto actuaría como el “segundo golpe” o señal adicional para el inicio de una enfermedad autoinmune^{5, 30, 31}. Desafortunadamente, pueden existir muchos “segundos golpes” que hoy en día no se tienen identificados.

3) Linfopenia y Fenómenos de Autoinmunidad

Como ya se mencionó previamente, la linfopenia por sí misma, es incapaz de producir enfermedad autoinmune, pero es una característica que se observa muy frecuentemente en este tipo de patología, tanto en enfermedades autoinmunes órgano-específicas, como sistémicas⁵.

Lo anterior es reconocido desde hace varias décadas, por los experimentos realizados por Penhale y cols³², en los cuales se observó que ratones que fueron sometidos en periodos neonatales a depleción de células T con radioablaciones subletales y resección de tejido tímico, este estado crónico de linfopenia se asoció a alta prevalencia de tiroiditis autoinmune, así como generación de autoanticuerpos³². Estos hallazgos fueron corroborados en otras patologías autoinmunes órgano-específicas e incluso en diversos modelos animales³³. La diabetes tipo 1, es la patología órgano-específica más estudiada en modelos animales como prototipo de enfermedad autoinmune, ya que existen diversas especies murinas que presentan afección prácticamente idéntica a la de los humanos con esta patología³⁴. A principio de la década de los ochentas, experimentos con ratas BB, demostraron como la linfopenia tenía una fuerte correlación con la presencia de infiltrado linfocítico en tejido pancreático y por ende una relación con el desarrollo de diabetes insulino-dependiente, dichos experimentos fueron los que dieron la base para la búsqueda de genes susceptibles (relacionados o no como el complejo mayor de histocompatibilidad) para el desarrollo de patología autoinmune asociada a linfopenia³⁵, e incluso a demostrar que la linfopenia es una condición *sine qua non* para el desarrollo de diabetes e insulinitis y, frecuentemente de tiroiditis^{36,37}, condición que no ha podido ser demostrada en patología en humanos, pero que sienta un precedente muy importante.

4) Linfopenia en lupus eritematoso generalizado

Con relación a las enfermedades autoinmunes sistémicas, el lupus eritematoso generalizado es la enfermedad prototipo de este grupo de padecimientos. La presencia de linfopenia es muy frecuente en

estos sujetos (pudiendo alcanzar prevalencia del 40%)^{38, 39}, pero contrario a lo que se tenía de conocimiento hace varios años, en donde la linfopenia se asociaba únicamente a actividad de la enfermedad, en fechas más recientes, se ha observado que los sujetos con LEG y linfopenia (asociado o no a actividad de la enfermedad) tienen diversas asociaciones con manifestaciones clínicas, más allá de una asociación epidemiológica⁴⁰⁻⁴⁴.

Las principales asociaciones que se han encontrado entre LEG y linfopenia, incluyen a ésta como factor de riesgo independiente para la progresión de placa carotídea⁴⁰, actividad neuropsiquiátrica⁴⁴, vasculitis visceral⁴⁵, nefritis⁴⁶ y como nuestro grupo de trabajo lo ha demostrado, asociada con infecciones graves (OR 5.2 IC 95% 2.39-11.3), púrpura trombocitopénica trombótica (OR 19.8 IC 95% 1.19-32.8) y síndrome de encefalopatía posterior reversible (OR 5.76 IC 95% 1.36-24.4)⁴¹⁻⁴³.

Existen varios mecanismos por los cuales los pacientes con LEG pueden presentar linfopenia. Uno de los primeros mecanismos descritos a este respecto (y uno de los más plausibles hasta hoy) fue descrito hace más de 40 años, en donde dos grupos de investigación detallaron por primera vez la presencia de autoanticuerpos contra linfocitos en pacientes con LEG⁴⁷. Posteriormente, Winfield y cols lograron demostrar por primera vez una relación inversamente proporcional entre la presencia de anticuerpos antilinfocitos y el grado de linfopenia en pacientes con LEG, sugiriendo así, un rol citotóxico de dichos anticuerpos^{48, 49}. Años más tarde se describió que estos autoanticuerpos presentaban también especificidades contra distintos tipos de poblaciones linfocitarias dependiendo el grado de activación de células T. También se ha observado, que la presencia de anticuerpos linfocitotóxicos puede encontrarse en relación directa con la actividad de la enfermedad, pero sin correlacionar directamente con la presencia de linfopenia, lo cual ha generado el estudio de mecanismos moleculares alternos que expliquen la linfopenia en pacientes con LEG, además de la presencia de autoanticuerpos antilinfocitos^{50, 51}. Dentro de los otros mecanismos asociados a linfopenia, el mediado por el complemento tiene una importancia relevante asociado con la presencia de hemocitopenias y fenómenos autoinmunitarios. Dos proteínas ancladas a membrana (CD 55 y CD 59)⁵², las cuales tienen la función primordial en la regulación del complemento, se observaron con disminución en la expresión medida mediante Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) por citometría de flujo, ya sea en serie roja (anemia hemolítica autoinmune asociada o no a LEG), plaquetas (trombocitopenia autoinmune y serie blanca (linfopenia en LEG). A este último respecto, García-Valladares y cols, demostraron que los pacientes con LEG y linfopenia tenían una IMF significativamente menor de CD55 y CD59 que aquellos sin linfopenia y controles sanos, sin encontrarse una relación directa entre un tipo específico de autoanticuerpo y la linfopenia⁵³. En un estudio más reciente y detallado, se demostró que no solo la IMF era menor, si no que la cantidad de linfocitos CD55⁺/CD59⁺ era mayor en pacientes con LEG y linfopenia que en controles sanos⁵⁴. Con lo anterior, es probable que este sea uno de los puntos de inflexión entre la presencia autoanticuerpos específicos (v.g. linfocitotóxicos), expresión a la baja de CD55/CD59 y linfopenia, pero al momento dichas teorías no se encuentran aclaradas.

Por último, la apoptosis y sobre todo la alteración en el aclaramiento de los residuos apoptóticos, es bien conocido como uno de los mecanismos en la fisiopatogénesis del LEG. Amasaki y cols⁵⁵ fueron los pioneros en proponer a la apoptosis como un mecanismo generador de linfopenia, demostrando

que los pacientes con LEG (sin importar tratamiento o puntaje de actividad) presentaban mayor expresión de un antígeno de membrana mediador de apoptosis (Fas/CD95) tanto en células T vírgenes (CD45RO-) como en células de memoria (CD45RO+) y dicha molécula presentaba una relación inversamente proporcional a la cantidad de linfocitos circulantes en sangre periférica⁵⁵. Posteriormente, se demostró que en pacientes con LEG existía una eliminación selectiva de células T CD28+ (potente coestimulador para la activación de linfocitos T) y estas células depletadas presentaban alta expresión de CD95 (aunque no de Bcl-2), sugiriendo que la coestimulación mediada por CD28 influencia directamente la susceptibilidad a la muerte celular inducida por actividad y por lo tanto a la presencia de linfopenia en este grupo de pacientes. Adicional a la apoptosis “clásica” mediada por receptores membranales (Fas/FasL)⁵⁶, otro tipo de muerte celular asociada a permeabilidad mitocondrial llamada muerte celular pasiva (“neglect-apoptosis”) ha sido descrita en pacientes con LEG. En este estudio se demostró que pacientes con LEG con y sin manifestaciones neuropsiquiátricas, presentaban una mayor cantidad de apoptosis celular pasiva la cual correlacionaba con una cuenta absoluta de linfocitos disminuida en sangre periférica; aún más, al incubar los linfocitos con sueros autólogo, solo los pacientes con LEG y manifestaciones neuropsiquiátricas presentaron correlación con linfopenia⁵⁷, lo que sugiere que diversos elementos en el suero (probablemente citocinas y autoanticuerpos específicos) son relevantes para el estímulo apoptótico⁵.

Con lo anteriormente expuesto, queda de manifiesto que la linfopenia en LEG parece presentarse como secundaria a una desregulación en varios mecanismos involucrados en la homeostasis, pero que actualmente no queda del todo claro en humanos, como se suceden los eventos para presentar linfopenia, el grado de linfopenia en cada paciente, que tanto difiere una linfopenia por actividad de una linfopenia persistente, y la traducción clínica de estos hallazgos.

5) Lupus eritematoso generalizado e Interleucina-7

Si bien existe bastante información de cómo actúa la IL-7 y su interacción con el receptor y activación del mismo; cuando se habla de patologías como LEG, la información es escasa. A este respecto, en fechas reciente se ha descrito a nivel sérico, que los niveles altos del receptor soluble de IL-7 en sujetos con LEG, guardan una estrecha relación con la actividad de la enfermedad, principalmente con la nefritis^{58, 59} y también se ha encontrado asociado a la presencia de anticuerpos antiC1q⁵⁹. Por otro lado, se ha descrito un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) del IL-7r (rs6897932 [C/T]), el cual confiere un riesgo límite pero aumentado para padecer LEG en pacientes de etnicidad asiática⁶⁰. Este mismo SNP se ha visto relacionado a una mayor susceptibilidad en otras enfermedades autoinmunes como son esclerosis múltiple y diabetes mellitus tipo 1^{61, 62}.

En resumen, la linfopenia se encuentra involucrada en los procesos de autoinmunidad, y teniendo en cuenta que la supervivencia celular de los linfocitos se encuentra dada, en mayor medida por la IL-7, la proliferación inducida por linfopenia, será el mecanismo compensador esperable bajo estados de linfopenia transitoria. Sin embargo, en patologías autoinmunes sistémicas, en donde la linfopenia suele presentarse de manera persistente (principalmente en LEG), se desconocen los mecanismos implicados en la regulación de la expresión del IL-7r, ni el comportamiento de esta expresión a nivel

de membrana, sobre todo en las células más dependientes de este mecanismo como son las células T CD4+ vírgenes y las de memoria.

Planteamiento del problema y Justificación

El LEG es considerado el prototipo de las enfermedades autoinmunes sistémicas y se ha demostrado que los pacientes con LEG muestran una alta prevalencia de linfopenia y múltiples anormalidades en los mecanismos de tolerancia periférica. Sin embargo, no se han evaluado los mecanismos moleculares asociados a linfopenia en LEG, ni aquellos relacionados con la regulación de la expresión del receptor de IL-7.

Se desconoce a detalle la expresión a nivel de membrana del IL-7r en las diversas subpoblaciones de células T CD4+, y la relación que guarda esta expresión con los niveles de linfocitos totales, así como si esta expresión se encuentra alterada en pacientes con LEG activo o con remisión de la enfermedad. Así mismo, se desconoce si el IL-7r sufre modificaciones postraduccionales mediadas por ubiquitinación, que regulen la degradación de este receptor.

La evaluación de los mecanismos de regulación de IL-7r asociados a linfopenia en LEG, así como conocer la expresión diferencial de este receptor en diversas poblaciones celulares, será de gran relevancia para ampliar el esquema fisiopatogénico de la enfermedad.

Objetivo primario:

Evaluar la expresión diferencial del IL-7r (CD127) en distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ (totales, vírgenes, memoria efectora) en pacientes con LEG activos o en remisión y controles sanos.

Objetivos secundarios:

Comparar la expresión del IL-7r en membrana según la presencia o no de linfopenia y actividad o no de la enfermedad en pacientes con LEG.

Comparar la expresión del IL7r en pacientes con LEG y controles sanos, así como su asociación con la presencia de linfopenia y actividad de la enfermedad en pacientes con LEG.

Evaluar la potencial asociación entre IL-7r y ubiquitinación como mecanismo de regulación de dicho receptor en pacientes con LEG y controles sanos.

Hipótesis:

Los pacientes con LEG y linfopenia, debido al efecto de la proliferación inducida por linfopenia, presentarán elevada expresión de IL-7r en las diferentes poblaciones de células T. Dicha expresión, no será modificada por la presencia de actividad de la enfermedad.

Material y Métodos

Se realizó un estudio transversal, comparativo

Criterios de inclusión:

Pacientes con LEG de 16 a 50 años de edad que acudieron al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Debían cumplir por lo menos cuatro criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para LEG⁶³ y estar en remisión (SLEDAI=0 puntos, sin tratamiento inmunosupresor en el año previo a la toma de muestra, solo se permitió antipalúdico en dosis máxima de 200mg/día) o tener enfermedad activa (SLEDAI \geq 6 puntos, sin uso de ningún medicamento inmunosupresor en el mes previo a la toma de muestra). Se incluyeron controles sanos, sin historia de autoinmunidad en familiares de primer grado.

Se utilizó como definición operacional de linfopenia, a aquellos pacientes que presentaron al momento del ingreso al estudio, cuentas de linfocitos totales en sangre periférica \leq 1,500c/mcl. Así mismo, se definió linfopenia persistente o crónica a aquellos sujetos que ingresaron al estudio con esta misma cifra absoluta, pero que se corroboró mediante el expediente clínico del paciente, que en sus últimas 3 visitas (o un año previo) mantuvieran siempre conteos totales de linfocitos periféricos \leq 1,500c/mcl.

Criterios de exclusión:

Mujeres embarazadas, pacientes con infecciones virales crónicas (VIH, virus de hepatitis B o C, etc.), otra inmunodeficiencia, pacientes trasplantados o en terapia de remplazo renal, otra enfermedad autoinmune (excepto síndrome de anticuerpos antifosfolípidos), uso de terapia biológica en el último año, datos de infección al momento de la toma de muestra y otras causas de linfopenia (cirrosis hepática, medicamentos no inmunosupresores, malignidades, radioterapia, timentomizados, etc.).

Tamaño de muestra:

Se realizó a partir de la expresión de CD127 tomando en cuenta la media y la desviación estándar en células T CD4+ de pacientes con LEG, con una significancia a dos colas del 5% y un poder del 95%, con una delta de 0.35

$$N = \frac{2Ks^2}{\Delta^2} \quad N = \frac{2.038}{0.1225} \quad N = 16.7 + 10\% = 18 \text{ sujetos por grupo}$$

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. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante prueba t de Student para muestras independientes. Para el análisis entre grupos se utilizó prueba de ANOVA de una vía. Se consideró como significancia estadística una $p \leq 0.05$. El análisis se realizó con apoyo del programa estadístico SPSS para Windows v21.0.

Consideraciones éticas:

La participación de los pacientes y controles fue voluntaria; cada individuo firmó una hoja de consentimiento informado por duplicado. Los investigadores se apegaron a los preceptos de la Declaración de Helsinki. Asimismo, se siguieron los lineamientos éticos en materia de investigación que señala la Norma Oficial Mexicana (NOM 166-SSA1-1997). El protocolo de investigación contó con aprobación por los comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (Referencia:1242).

Procedimiento del estudio:

Pacientes y controles

Posterior a la firma del consentimiento informado, se obtuvieron 10ml de sangre mediante punción de vena antecubital en todos los sujetos (en 10 sujetos se tomaron 80ml para realización de inmunoprecipitación). Se registraron variables clínicas, demográficas y de laboratorio en todos los casos, así como una muestra de biometría hemática. En el caso de los pacientes con LEG, se calculó el índice de actividad de la enfermedad (SLEDAI score, por sus siglas en inglés)⁶⁴.

1. Aislamiento de Células Mononucleares (CMN) de sangre venosa periférica:

Una vez obtenida la muestra, se procedió a la separación de las CMN mediante gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque). Posterior a la separación y lisado de eritrocitos, se realizó determinación de cifra celular con viabilidad (mediante exclusión con azul tripano).

2. Análisis de la expresión de CD127 mediante citometría de flujo multiparamétrica:

Una vez determinado el conteo de CMN, se separaron 3 millones para analizarse mediante citometría de flujo. Las muestras fueron resuspendidas en amortiguador de tinción, y se procedió a tinción de superficie (3 μ l por muestra) para los siguientes marcadores: CD4 (V450), CCR7 (AF700), CD27 (PerCP-Cy5.5) y CD127 (BV510). Posteriormente, dichas muestras fueron adquiridas en citómetro de flujo (BD LSRFortessa) y los datos se analizaron con el software Flow-Jo v.10. Para la selección de los linfocitos se realizó mediante tamaño y granularidad (Side Scatter vs Forward Scatter). Una vez seleccionada esta población, se determinó el grupo celular que expresaba CD4-V450 y se seleccionó esta población como linfocitos T CD4+. De esta población se partió para la selección del resto de subpoblaciones, siendo CD4+CCR7+CD27+ células vírgenes, y las CD4+CCR7-CD27- células efectoras de memoria. De cada una de estas poblaciones celulares, se determinó el porcentaje de células positivas para CD127 y se determinó la IMF en cada caso. (Apéndice I).

3. Ensayo de Inmunoprecipitación y Western Blot:

De los sujetos que se obtuvieron 80ml de sangre venosa periférica, posterior a separación de CMN, se realizó selección para células T CD4+ mediante selección negativa con microesferas magnéticas (pureza \geq 95%). Una vez obtenidas las células T CD4+ se procedió a lisis mediante amortiguador (ELB) y cuantificación de proteínas mediante método de ácido bicinonínico (BCA) para su análisis por Western blot. De los lisados celulares de CD4 totales, se realizó mediante método directo, la inmunoprecipitación de CD127 (anticuerpo R&D), para posteriormente realización de electroforesis en un gel de poliacrilamida (7.5%). Se realizó transferencia húmeda a membranas de PVDF o de nitrocelulosa. Posteriormente se realizó Western blot para la detección de anticuerpos anti-ubiquitina

total, anti-K48 (para reconocer proteínas poliubicitinadas a través de la lisina 48) y anti-K63 (para reconocer proteínas poliubicitinadas a través de la lisina 63). Se emplearon anticuerpos secundarios correspondientes y se revelaron mediante quimioluminiscencia. Fueron analizados mediante un analizador de imágenes digital con cámara CCD (Chemidoc MP, Biorad) y fueron cuantificados mediante densitometría con el programa ImageLab (Biorad).

Resultados

Se ingresaron un total de 76 sujetos al estudio, siendo 56 pacientes con LEG y 20 controles sanos. Todos los pacientes ingresados fueron del sexo femenino.

1.- Los pacientes con LEG presentan una mayor expresión de células CD127+ en diversas poblaciones de linfocitos T CD4+ en relación a controles:

La primera comparación que se realizó se llevó a cabo entre sujetos con LEG (de manera global, sin importar actividad de la misma, ni la cuenta de linfocitos totales) y los sujetos sanos. En la Tabla 1, se muestran las características demográficas, clínicas y en análisis de subpoblaciones celulares en linfocitos T, realizado mediante citometría de flujo. Como es esperable, la población con LEG presentó cifras absolutas de linfocitos en sangre periférica menores que los controles (1320 ± 734 vs 1981 ± 577 c/mclx 10^3 , $p=0.001$). Se observa como el porcentaje de células positivas para CD127 en las diversas poblaciones celulares (CD4CD127, TEMCD127, T vírgenesCD127), así como las IMF del CD127, fueron mucho mayores en los sujetos con LEG en comparación con los controles, siendo en todos los casos, estadísticamente significativo (ver Gráfica 1 y 2, Apéndice II).

2.- Los pacientes con LEG activo presentan una mayor expresión de células CD127+ en las diversas poblaciones de linfocitos T CD4+ al ser comparados contra sujetos con LEG en remisión con o sin linfopenia

Posteriormente se dividió la población de estudio en cuatro grupos para el análisis: LEG activos con linfopenia (SLEDAI ≥ 6 puntos, linfocitos totales en sangre periférica $\leq 1,500$ c/mclx 10^3), LEG remisión con linfopenia (SLEDAI=0 puntos, linfocitos totales en sangre periférica $\leq 1,500$ c/mclx 10^3), LEG remisión sin linfopenia (SLEDAI ≥ 6 puntos, linfocitos totales en sangre periférica $>1,500$ c/mclx 10^3) y controles sanos (Tabla 2).

En lo que respecta al porcentaje total de linfocitos que corresponde a T vírgenes y a T efectoras de memoria totales, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de sujetos analizados (Gráfica 3). El resultado de mayor importancia, queda demostrado en la Gráfica 4, en donde se observa que en tanto en las células T vírgenes como en las células TEM, el porcentaje de células positivas para CD127 en todos los grupos comparados, fue mucho mayor en los sujetos del grupo LEG activo con linfopenia (ver Apéndice II). Esta condición de un aumento en la expresión de CD127, es la respuesta esperable antes la presencia de linfopenia, pero solo fue observada en los pacientes con LEG activo con linfopenia, y no así en los LEG en remisión con linfopenia. Por lo que parecería que la condición de actividad del LEG es la causa de esta respuesta adecuada generada por LIP. Al

analizar la expresión de CD127 mediante IMF y los números absolutos de células CD127+ por subpoblaciones celulares, si bien el LEG activo demostró en números absolutos en CD4CD127 y TEMCD127 tener mayor expresión en LEG activo (ver Tabla 2), solo resultó con significancia estadística la población de TEMCD127 al ser comparado contra los controles (ver Gráfica 5).

3.- En los pacientes con LEG en remisión y linfopenia persistente, las subpoblaciones celulares de linfocitos T CD4+, presentan un fenómeno de “resistencia” a la proliferación inducida por linfopenia:

Si bien no se observaron diferencias significativas entre los linfocitos totales en sangre periférica entre los pacientes con LEG activo y LEG en remisión (ambos con linfopenia) (729 ± 397 vs 1049 ± 241 c/mclx 10^3 , $p=0.144$), es decir, se encontraron en la misma “profundidad” de linfopenia, al observar las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ (ver Tabla 2 y Gráfica 4) positivas para CD127, no se encontró una mayor expresión al ser comparadas con LEG en remisión sin linfopenia y con controles sanos (ver Apéndice II). Es decir, al parecer los pacientes con LEG en remisión con linfopenia, no presentan los mecanismos convencionales para generar una expansión de estas subpoblaciones celulares, como sería lo esperable. Es importante mencionar, que este grupo de pacientes en LEG en remisión con linfopenia, el 90% de estos sujetos presentaron linfopenia crónica o persistente (linfocitos totales $<1,000$ c/mclx 10^3) previo a su ingreso al estudio (corroborado en su expediente clínico), lo cual sugiere una regulación a la baja o de adaptación en los mecanismos compensatorios para salir de este estado de linfopenia persistente.

Discusión

En este estudio, se demuestra como la expresión del receptor de la IL-7 se comporta de manera distinta entre diversos grupos de sujetos que padecen lupus eritematoso generalizado. Como se observa, el principal hallazgo, revela que los pacientes con LEG activo, tienen una mayor expresión de IL-7r en distintas subpoblaciones de células T CD4+, característicamente en las células que más dependen de la vía de IL-7 (células vírgenes y células de memoria efectoras). De hecho, estos hallazgos concuerdan con los datos publicados en relación a la expresión del IL-7r, ya que se encontraban con linfopenia acentuada, y por proliferación inducida por linfopenia⁷ (LIP), se generarán altos niveles de IL-7 circulantes y por ende del receptor; estos resultados no se encuentran influenciados por los inmunosupresores, los cuales se han reportado que pueden modificar la expresión de IL-7r⁶⁵. Lo que se destaca más en estos hallazgos, es el que el grupo de pacientes con LEG y linfopenia, pero que se encontraban en remisión, tuvieron una expresión “normal” del IL-7r, traduciendo una respuesta inadecuada al estado de linfopenia, es decir, se mostró un fenotipo que sugiere la presencia de un fenómeno de “resistencia” a la LIP.

Cabe mencionar, que en estos sujetos con LEG y linfopenia en estados de remisión, los conteos linfocitarios fueron persistentemente bajos (el 90% de los pacientes en este grupo tuvieron linfocitos bajos en sangre periférica en las últimas tres visitas o un año previo al ingreso del estudio), lo que se traduce como una linfopenia crónica o persistente, la cual, es la que suele estar más asociada a patología autoinmune⁶⁶ y no como tal las deplecciones linfocitarias transitorias, las cuales se consideran en cierta medida fisiológicas.

Diversas explicaciones pudieran darse al fenómeno ya comentado, en donde la población con LEG y remisión con linfopenia, tengan “perdida” esta respuesta fisiológica para rescatar del estado de linfopenia crónica al sujeto, mediante la expresión a la alta del IL-7r. Una de las primeras explicaciones, es que, como se ha demostrado con anterioridad, los niveles de IL-7r se modifican con respecto a la edad⁶⁷, es decir a mayor edad, menor expresión constitutiva de IL-7r; como se observa, la población de LEG en remisión tenía mayor edad que pacientes con LEG activos (30 vs 38, $p=0.001$). Sin embargo, estas alteraciones con la edad, más bien se han asociado a sujetos mayores de 65 años, por lo que este hecho no pareciera explicar por completo los hallazgos en esa población. En sujetos con Linfopenia Idiopática de CD4 (ICL por sus siglas en inglés), la cual es una enfermedad poco frecuente de etiología no definida, en donde de manera persistente existen cuentas de CD4 $<300\text{cel}/\mu\text{cl}$ en ausencia de infecciones como VIH u otras inmunodeficiencias⁶⁸, que se caracteriza por susceptibilidad a infecciones y fenómenos de autoinmunidad, se han observado niveles “anormalmente” bajos de IL-7 sérica en estado de linfopenia persistente⁶⁹. Posteriormente otro grupo de investigadores demostró que en estos pacientes, existía una “resistencia” a la fosforilación de STAT5 en respuesta a IL-7, observándose niveles “anormalmente bajos” de IL-7r de predominio en CD4 de memoria⁷⁰, descartando que esta causa fuera por la generación de autoanticuerpos anti-IL7r o aumento en las fracciones solubles del CD127, lo que pareciera demostrar un defecto intrínseco de señalización de IL-7 al unirse con su receptor, generando así, un estado de linfopenia persistente, que no se puede rescatar por IL-7 circulante. Este defecto pudiera presentarse de igual manera en los sujetos con LEG con linfopenia persistente, incluso en sujetos sin actividad de la enfermedad, como lo observamos en nuestro estudio. Más aún, se ha demostrado también en ICD, que estos pacientes también tiene una respuesta muy disminuida a IL-2⁷¹, lo cual como se sabe, se encuentra muy asociado a inflamación, infiltrados linfocitarios multiorgánicos y patología autoinmune, tanto en modelos murinos, como en humanos⁷²⁻⁷⁴.

Otra posible explicación a este respecto, sería que en sujetos con LEG y linfopenia crónica, se presentarían niveles bajos de expresión de IL-7r debido a que su principal regulador implicado en el sistema de reciclaje/reuso, como es la PI3K Vps34, se encontrara alterada. De hecho, en nuestros resultados, los ensayos por inmunoprecipitación para evaluar la interacción del IL-7r con el sistema de ubiquitinación, fueron poco consistentes, lo que apoya una vía alterna para la regulación de la expresión de este receptor, como se ha demostrado con esta proteína Vps34^{20, 23}. Se ha descrito en pacientes con LEG, una variante genética a este nivel que predispone a esta enfermedad, con alta prevalencia de autoanticuerpos antiRo y La y niveles más elevados de IFN- α en suero⁷⁵. La evidencia actual sugiere que este defecto también se presenta en enfermedades neuropsiquiátricas, principalmente esquizofrenia⁷⁶, lo que pudiera explicar en parte, la mayor asociación de LEG con esta manifestación psiquiátrica^{77, 78}.

Como se comentó con anterioridad, existe una variante genética (SNP) en el gen que codifica la cadena alfa de IL-7r, la cual ha presentado asociación con autoinmunidad en humanos, principalmente con la presencia de diabetes tipo 1, artropatías crónicas inflamatorias y esclerosis múltiple^{61, 62}, siendo esta última patología en la cual existe mayor información sobre variantes genéticas a este nivel que predisponen a padecer esta patología del sistema nervioso central. En un estudio realizado por Haas y

colaboradores⁷⁹ se evaluaron subpoblaciones de células T (incluidas reguladoras) y la expresión de IL-7r, observándose como en todas las poblaciones evaluadas, la expresión medida mediante IMF fue significativamente menor con respecto a sujetos sanos. Así mismo, de manera interesante se demostró como las células T reguladoras tuvieron menor potencial de supresión sobre el resto de células T convencionales, y lo anterior correlacionando de manera directa con la IMF de IL-7r de estas células convencionales. Con lo anterior, parece ser que, al menos en sujetos con esclerosis múltiple, existe una resistencia a la supresión por parte de las células T reguladoras, las cuales son influidas de manera indirecta por la expresión de IL-7r en el resto de las poblaciones de células T convencionales. Si bien, se sabe que los pacientes con esclerosis múltiple no suelen tener estados de linfopenia crónica, se ha demostrado que se logra la expansión celular gracias a que el resto de mecanismos implicados en LIP parecen funcionar adecuadamente; sin embargo, estos hallazgos descritos por el grupo de Haas, guardan relación con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Como es sabido, los pacientes con LEG, entre otros varios defectos, presentan una resistencia a la supresión de la acción de células T reguladoras a nivel periférico⁸⁰, pudiendo ser los estados de linfopenia crónica con baja expresión de IL-7r, actores principales para esta desregulación, aunque desafortunadamente no se estudió esta población celular en nuestro trabajo.

Las principales limitantes de este estudio, son su carácter transversal, ya que se generaría mayor información mediante una evaluación periódica de los mismos sujetos en distintas fases de la enfermedad (LEG al diagnóstico, LEG bajo tratamiento inactivo, LEG remisión) para ver el comportamiento del IL-7r, para lo cual se requiere un estudio de cohorte. Por otro lado, la principal limitante en nuestro estudio, es la falta de determinación de los niveles séricos de IL-7 para poder realizar una correlación directa con la expresión de su receptor, para tener mayor claridad de la regulación del mismo. Se deberán realizar, así mismo, estudios funcionales para observar principalmente la fosforilación a nivel de JAK1/JAK3 y de STAT5 para corroborar nuestros hallazgos. Así también será de utilidad el evaluar otros mecanismos compensadores que actúan normalmente en la LIP, que pudieran presentar defectos en estos sujetos (mediciones de IL-2, IL-15, expresión de cadena γ común en el resto de subpoblaciones celulares, entre otras).

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que los sujetos con LEG activo y linfopenia presentan este fenómeno de adecuación a linfopenia, mediante una alta expresión de IL-7r en células T, debido a que existen múltiples mecanismos encargados de generar linfopenia en este grupo particular de pacientes con LEG, como pueden ser la presencia de autoanticuerpos contra linfocitos, citotoxicidad directa, lisis mediada por complemento, etc.⁵ Todos estos son mecanismos todos descritos en LEG para generar linfopenia, pero, relacionados con la actividad de la enfermedad, lo que pudiera explicar esta respuesta fisiológica adecuada al iniciarse la LIP. Sin embargo, los pacientes que tienen linfopenia crónica en LEG (incluso estando en remisión) parecen no tener mecanismos adicionales para contener la linfopenia, más que la propia regulación a la baja de la expresión del IL-7r, el cual pudiera ser un defecto intrínseco de señalización por su ligando, que se deberá de corroborar en estudios posteriores. Así mismo, es altamente probable que todos los mecanismos mediante los cuales se regula la expresión del IL-7r, sean como se ha descrito hasta la fecha, secundarios a mecanismos de internalización y reciclaje del receptor²³, y en muy poca medida a modificaciones postraduccionales a este nivel.

Tablas y Gráficas

Tabla 1. Comparación de variables demográficas, clínicas y expresión de CD127 en diversas subpoblaciones de linfocitos T, entre pacientes con LEG y controles sanos.

Variable	LEG (n=56) (media ± DE)	Controles (n=20) (media ± DE)	p
Edad (años)	35.05 ± 9.6	29.05 ± 7.2	0.002
SLEDAI (puntos)	4.42 ± 7.2	NA	NA
Linfocitos totales (c/mcl10 ³)	1320 ± 734	1981 ± 577	0.001
LT CD4 ⁺ (%)	31.4 ± 10.6	32 ± 9	0.82
LT CD4 ⁺ (totales)	445 ± 300	628 ± 230	0.021
CD4 ⁺ CD127 ⁺ (%)	21.5 ± 21.4	7.8 ± 5	0.001
CD4 ⁺ CD127 ⁺ (totales)	89.9 ± 137	46.4 ± 33	0.074
CD4 ⁺ IMF CD127	1633 ± 457	1304 ± 57	0.001
TEM (CD27 ⁺ CCR7 ⁺) (%)	20.3 ± 20.8	9.9 ± 4.1	0.006
TEM (CD27 ⁺ CCR7 ⁺) (totales)	106 ± 191	60 ± 28	0.300
TEM CD127 ⁺ (%)	28.6 ± 24.2	17.1 ± 6.8	0.010
TEM CD127 ⁺ (totales)	30.9 ± 83.4	10.2 ± 6	0.274
TEM IMF CD127	1539 ± 339	1306 ± 71	0.002
T vírgenes (CD27 ⁺ CCR7 ⁺) (%)	36.4 ± 23.8	55.1 ± 12.4	0.0001
T vírgenes (CD27 ⁺ CCR7 ⁺) (totales)	176 ± 196	335 ± 191	0.005
T vírgenes CD 127 ⁺ (%)	42.4 ± 37.4	7.5 ± 5.3	0.0001
T vírgenes CD 127 ⁺ (totales)	66.8 ± 141	25 ± 23.4	0.087
T vírgenes IMF CD127	1483 ± 570	1252 ± 61.3	0.020

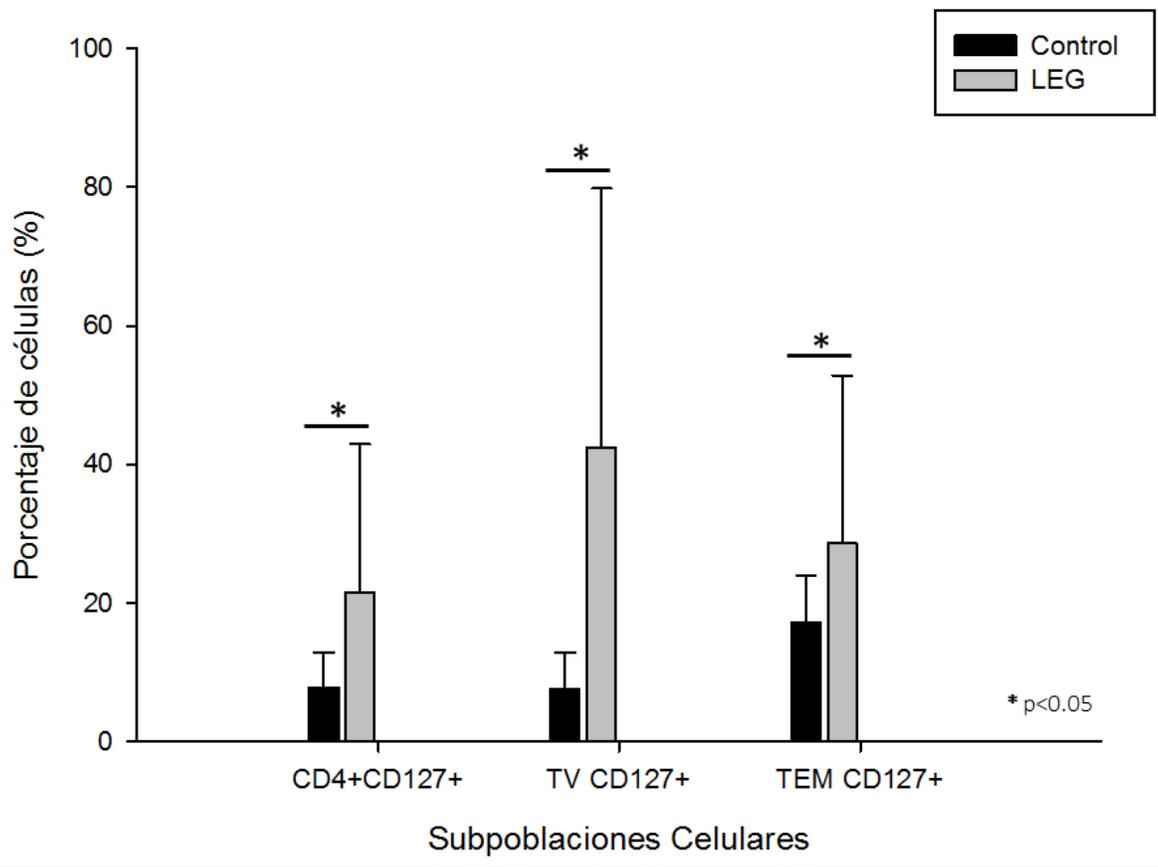
DE=Desviación Estándar; NA=No Aplica; LT=Linfocitos T; IMF= Intensidad Media de Fluorescencia; TEM= células T de Memoria Efectoras

Tabla 2. Comparación de variables demográficas, clínicas y expresión de CD127 en diversas subpoblaciones de linfocitos T, entre pacientes con LEG activo, LEG en remisión con y sin linfopenia y controles sanos.

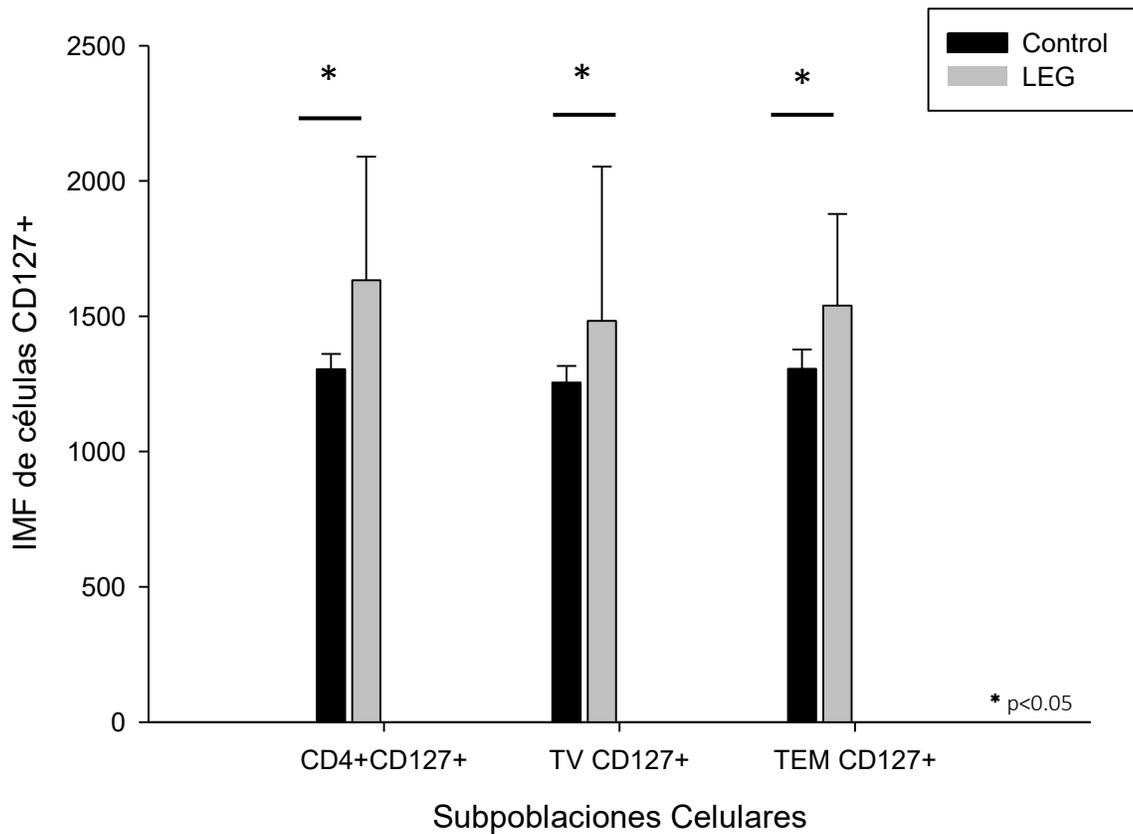
Variable	LEG activo Linfopenia (n=14) (media ± DE)	LEG remisión Linfopenia (n=10) (media ± DE)	LEG remisión sin linfopenia (n=14) (media ± DE)	Controles (n=20) (media ± DE)	p
Edad (años)	30 ± 10.3	38.8 ± 9.1	37.3 ± 8	29 ± 7.2	0.001
SLEDAI (puntos)	14.5 ± 5.5	0	0	NA	N/A
Linfocitos totales (c/mcl10 ³)	729 ± 397	1049 ± 241	2029 ± 596	1981 ± 577	0.001
LT CD4 ⁺ (%)	24.8 ± 9.8	32.8 ± 10.7	37.2 ± 8.2	32 ± 9	0.011
LT CD4 ⁺ (totales)	195.7 ± 150	345 ± 142	745.8 ± 219	628 ± 230	0.001
CD4 ⁺ CD127 ⁺ (%)	33.4 ± 21.5	13.4 ± 19.1	16.5 ± 18.6	7.8 ± 5	0.001
CD4 ⁺ CD127 ⁺ (totales)	70.8 ± 66.7	39.3 ± 60	144 ± 199	46.4 ± 33	0.052
CD4 ⁺ IMF CD127	1952 ± 437	1627 ± 604	1469 ± 248	1304 ± 57	0.001
TEM (CD27 ⁺ CCR7 ⁺) (%)	18.7 ± 11	14.1 ± 5.6	26.8 ± 31.1	9.9 ± 4.1	0.042
TEM (CD27 ⁺ CCR7 ⁺) (totales)	44 ± 55	47 ± 24	209 ± 284	60 ± 28	0.010
TEM CD127 ⁺ (%)	43.6 ± 18.2	5.6 ± 3.1	21.1 ± 19.1	17.1 ± 6.8	0.001
TEM CD127 ⁺ (totales)	21 ± 31	6.2 ± 7.9	57 ± 130	10.2 ± 6	0.168
TEM IMF CD127	1914 ± 362	1461 ± 315	1399 ± 203	1306 ± 71	0.001
T vírgenes (CD27 ⁺ CCR7 ⁺) (%)	33.3 ± 24.1	35.1 ± 21.8	38 ± 25	55.1 ± 12.4	0.018
T vírgenes (CD27 ⁺ CCR7 ⁺) (totales)	63 ± 74	144 ± 133	296 ± 250	335 ± 191	0.001
T vírgenes CD 127 ⁺ (%)	74.5 ± 19	20.8 ± 33.1	28.1 ± 34.2	7.5 ± 5.3	0.001
T vírgenes CD 127 ⁺ (totales)	45 ± 58	37 ± 100	107 ± 205	25 ± 23	0.211
T vírgenes IMF CD127	1491 ± 864	1600 ± 450	1386 ± 328	1252 ± 61.3	0.239

DE=Desviación Estándar; NA=No Aplica; LT=Linfocitos T; IMF= Intensidad Media de Fluorescencia; TEM= células T de Memoria Efectoras

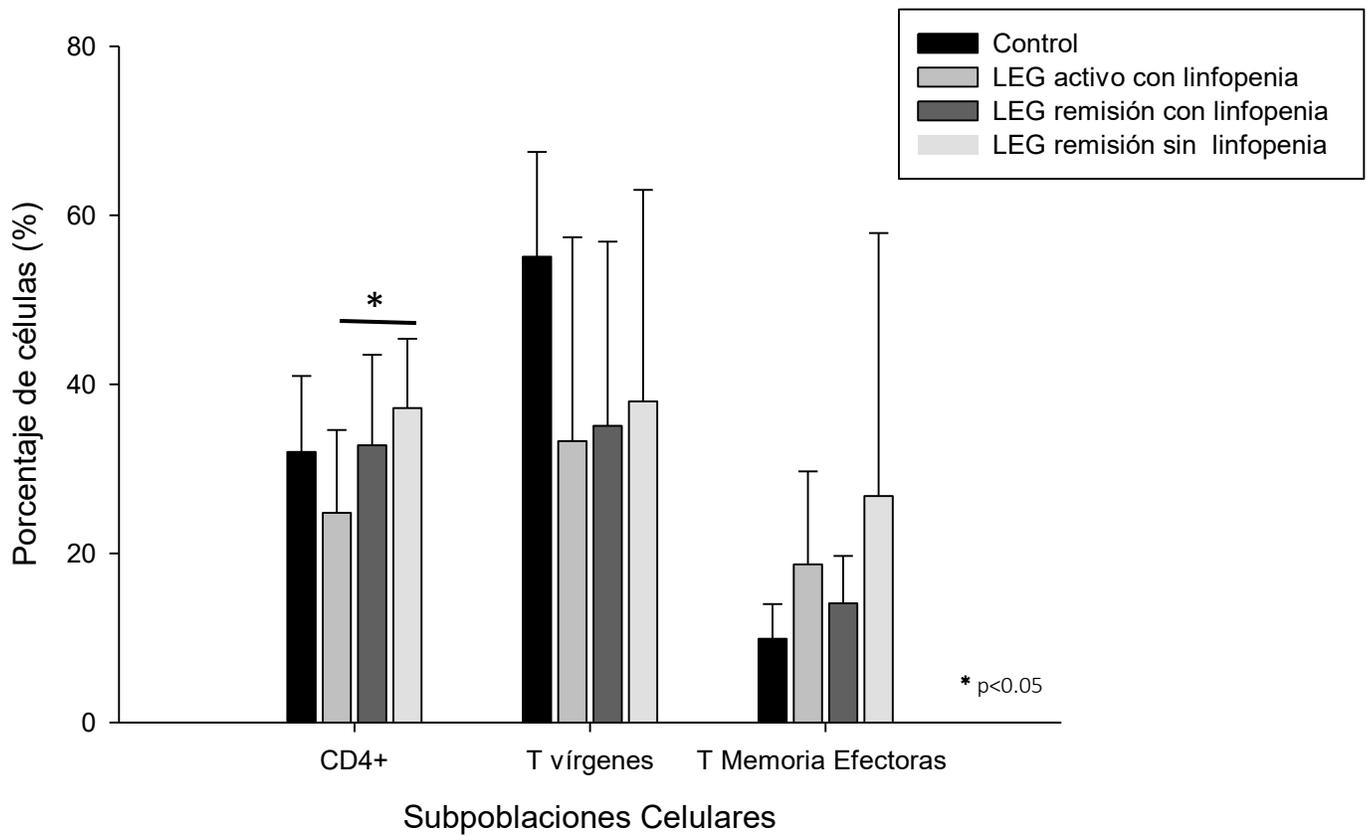
Gráfica 1. Porcentaje de células que expresan CD127 en diversas subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo, comparación entre LEG y controles sanos.



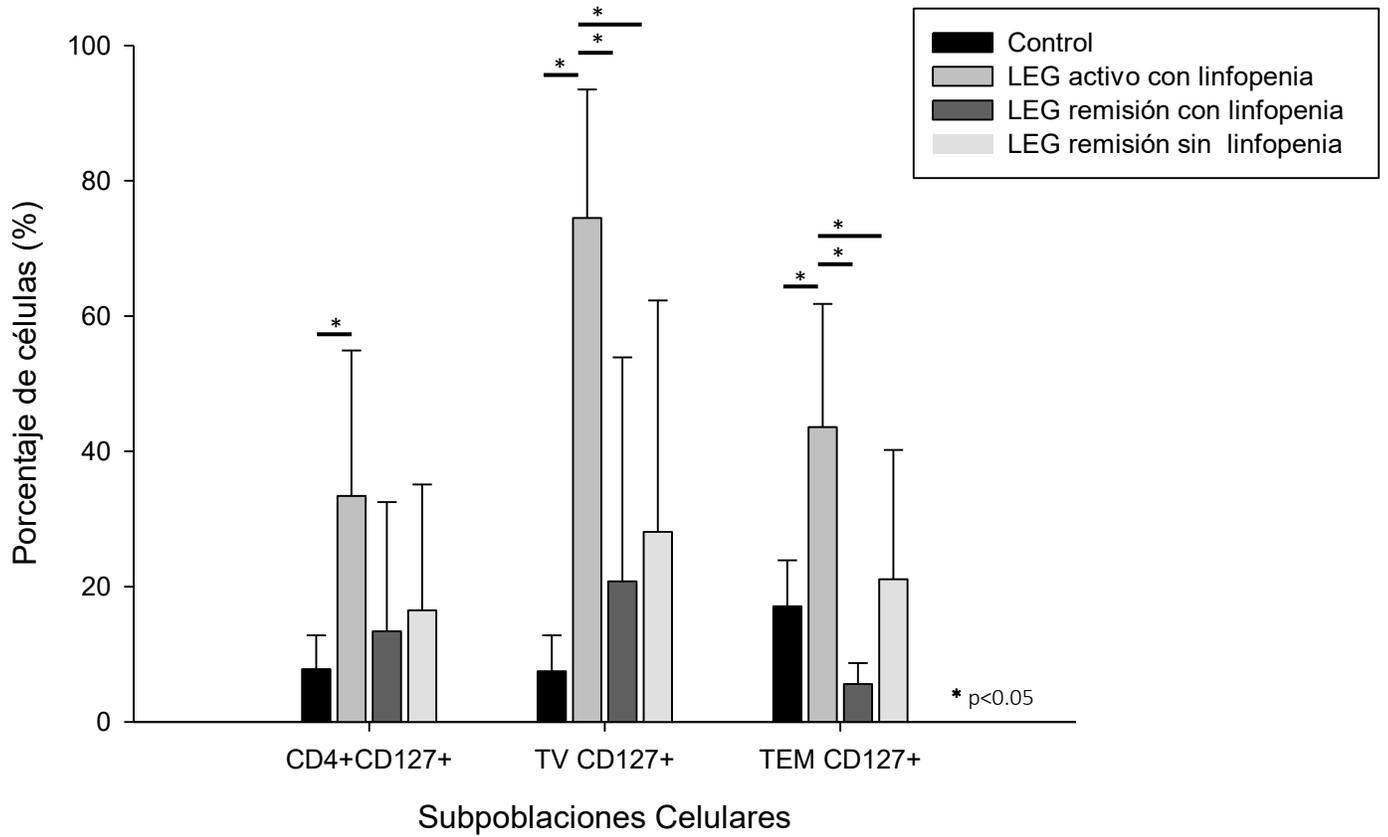
Gráfica 2. Expresión de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de CD127 en diversas subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo, comparación entre LEG y controles sanos.



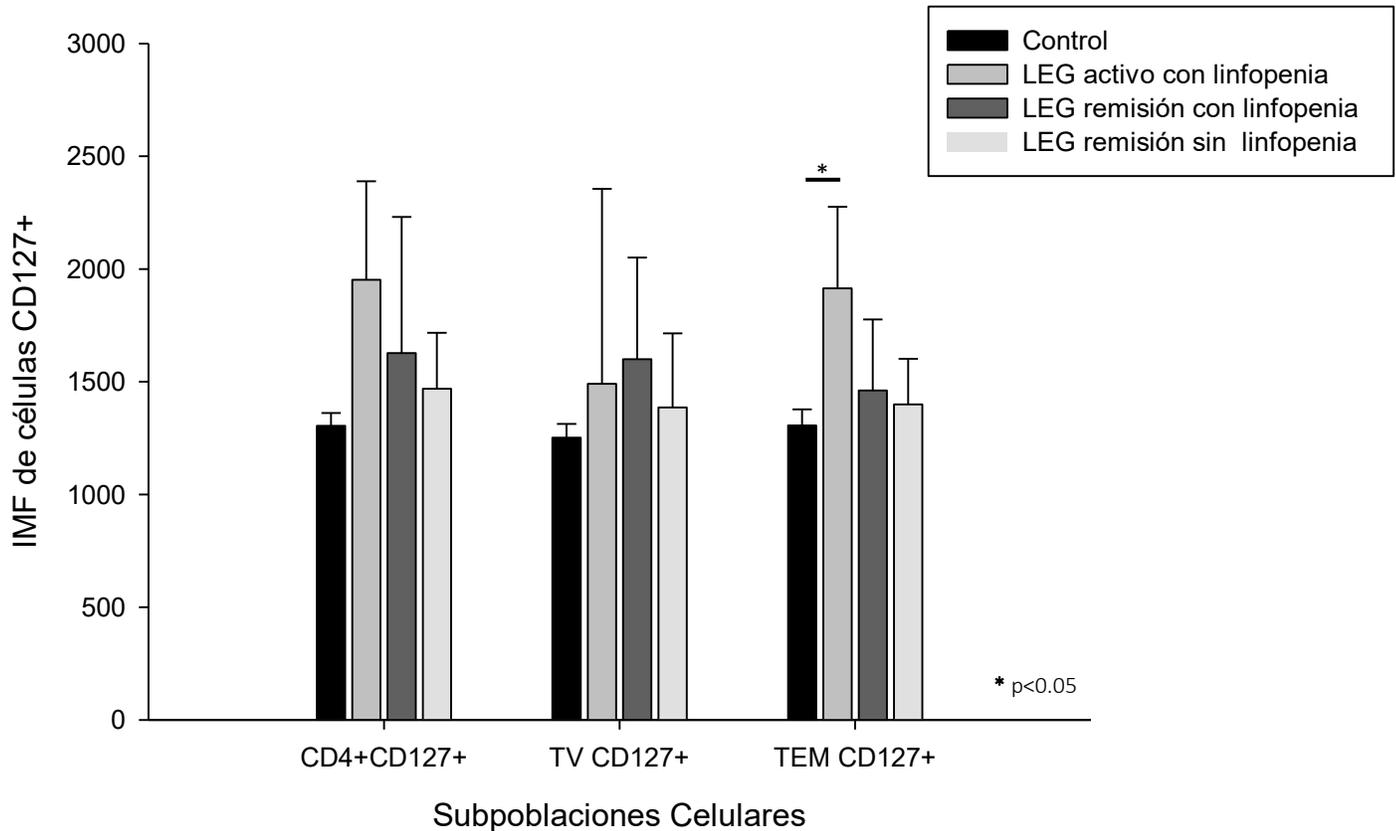
Gráfica 3. Porcentaje de células totales en diversas subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo, comparación entre LEG activos, LEG en remisión con y sin linfopenia y controles sanos.



Gráfica 4. Expresión de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de CD127 en diversas subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo, comparación entre LEG activos, LEG en remisión con y sin linfopenia y controles sanos.



Gráfica 5. Expresión de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de CD127 en diversas subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo, comparación entre LEG activos, LEG en remisión con y sin linfopenia y controles sanos.



Referencias

1. von Freeden-Jeffrey U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in Interleukin (Il)-7 Gene-Deleted Mice Identifies Il-7 as a Nonredundant Cytokine. *J Exp Med* 1995; **181**(4): 1519-26.
2. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New Insights into the Regulation of T Cells by Gamma(C) Family Cytokines. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**(7): 480-90.
3. Kim GY, Hong C, Park JH. Seeing Is Believing: Illuminating the Source of in Vivo Interleukin-7. *Immune Netw* 2011; **11**(1): 1-10.
4. Fry TJ, Connick E, Falloon J, et al. A Potential Role for Interleukin-7 in T-Cell Homeostasis. *Blood* 2001; **97**(10): 2983-90.
5. Merayo-Chalico J, Rajme-Lopez S, Barrera-Vargas A, Alcocer-Varela J, Diaz-Zamudio M, Gomez-Martin D. Lymphopenia and Autoimmunity: A Double-Edged Sword. *Hum Immunol* 2016; **77**(10): 921-9.
6. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-Driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory, and Effector Memory Cd4(+) T Cells. *J Exp Med* 2001; **194**(12): 1711-9.
7. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, et al. Il-7 Is Critical for Homeostatic Proliferation and Survival of Naive T Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(15): 8732-7.
8. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al. Early Lymphocyte Expansion Is Severely Impaired in Interleukin 7 Receptor-Deficient Mice. *J Exp Med* 1994; **180**(5): 1955-60.

9. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-Cells in Autoimmune Diseases: Challenges, Controversies and--yet--Unanswered Questions. *Autoimmun Rev* 2015; **14**(2): 105-16.
10. Imada K, Leonard WJ. The Jak-Stat Pathway. *Mol Immunol* 2000; **37**(1-2): 1-11.
11. Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. Interleukin-7 Promotes the Survival of Human Cd4+ Effector/Memory T Cells by up-Regulating Bcl-2 Proteins and Activating the Jak/Stat Signalling Pathway. *Immunology* 2010; **130**(3): 418-26.
12. Crawley AM, Vranjkovic A, Faller E, et al. Jak/Stat and Pi3k Signaling Pathways Have Both Common and Distinct Roles in Il-7-Mediated Activities in Human Cd8+ T Cells. *J Leukoc Biol* 2014; **95**(1): 117-27.
13. Jatzek A, Tejera MM, Singh A, Sullivan JA, Plisch EH, Suresh M. P27(Kip1) Negatively Regulates the Magnitude and Persistence of Cd4 T Cell Memory. *J Immunol* 2012; **189**(11): 5119-28.
14. Carrette F, Surh CD. Il-7 Signaling and Cd127 Receptor Regulation in the Control of T Cell Homeostasis. *Semin Immunol* 2012; **24**(3): 209-17.
15. Ramsey C, Rubinstein MP, Kim DM, Cho JH, Sprent J, Surh CD. The Lymphopenic Environment of Cd132 (Common Gamma-Chain)-Deficient Hosts Elicits Rapid Homeostatic Proliferation of Naive T Cells Via Il-15. *J Immunol* 2008; **180**(8): 5320-6.
16. Calzascia T, Pellegrini M, Lin A, et al. Cd4 T Cells, Lymphopenia, and Il-7 in a Multistep Pathway to Autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(8): 2999-3004.
17. Tenbrock K, Tsokos GC. Transcriptional Regulation of Interleukin 2 in Sle T Cells. *Int Rev Immunol* 2004; **23**(3-4): 333-45.
18. Faller EM, Ghazawi FM, Cavar M, MacPherson PA. Il-7 Induces Clathrin-Mediated Endocytosis of Cd127 and Subsequent Degradation by the Proteasome in Primary Human Cd8 T Cells. *Immunol Cell Biol* 2016; **94**(2): 196-207.
19. Vranjkovic A, Crawley AM, Gee K, Kumar A, Angel JB. Il-7 Decreases Il-7 Receptor Alpha (Cd127) Expression and Induces the Shedding of Cd127 by Human Cd8+ T Cells. *Int Immunol* 2007; **19**(12): 1329-39.
20. Backer JM. The Regulation and Function of Class Iii Pi3ks: Novel Roles for Vps34. *Biochem J* 2008; **410**(1): 1-17.
21. Williams RL, Urbe S. The Emerging Shape of the Escrt Machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(5): 355-68.
22. Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N, He YW. A Critical Role for the Autophagy Gene Atg5 in T Cell Survival and Proliferation. *J Exp Med* 2007; **204**(1): 25-31.
23. McLeod IX, Zhou X, Li QJ, Wang F, He YW. The Class Iii Kinase Vps34 Promotes T Lymphocyte Survival through Regulating Il-7ralpha Surface Expression. *J Immunol* 2011; **187**(10): 5051-61.
24. Kim HR, Hwang KA, Kim KC, Kang I. Down-Regulation of Il-7ralpha Expression in Human T Cells Via DNA Methylation. *J Immunol* 2007; **178**(9): 5473-9.
25. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. The Ubiquitin-Mediated Proteolytic Pathway: Mode of Action and Clinical Implications. *J Cell Biochem Suppl* 2000; **34**: 40-51.
26. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. Type I Interferons Directly Regulate Lymphocyte Recirculation and Cause Transient Blood Lymphopenia. *Blood* 2006; **108**(10): 3253-61.
27. Min B, Yamane H, Hu-Li J, Paul WE. Spontaneous and Homeostatic Proliferation of Cd4 T Cells Are Regulated by Different Mechanisms. *J Immunol* 2005; **174**(10): 6039-44.
28. Baccala R, Theofilopoulos AN. The New Paradigm of T-Cell Homeostatic Proliferation-Induced Autoimmunity. *Trends Immunol* 2005; **26**(1): 5-8.
29. Boyman O, Letourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic Proliferation and Survival of Naive and Memory T Cells. *Eur J Immunol* 2009; **39**(8): 2088-94.
30. Krupica T, Jr., Fry TJ, Mackall CL. Autoimmunity During Lymphopenia: A Two-Hit Model. *Clin Immunol* 2006; **120**(2): 121-8.

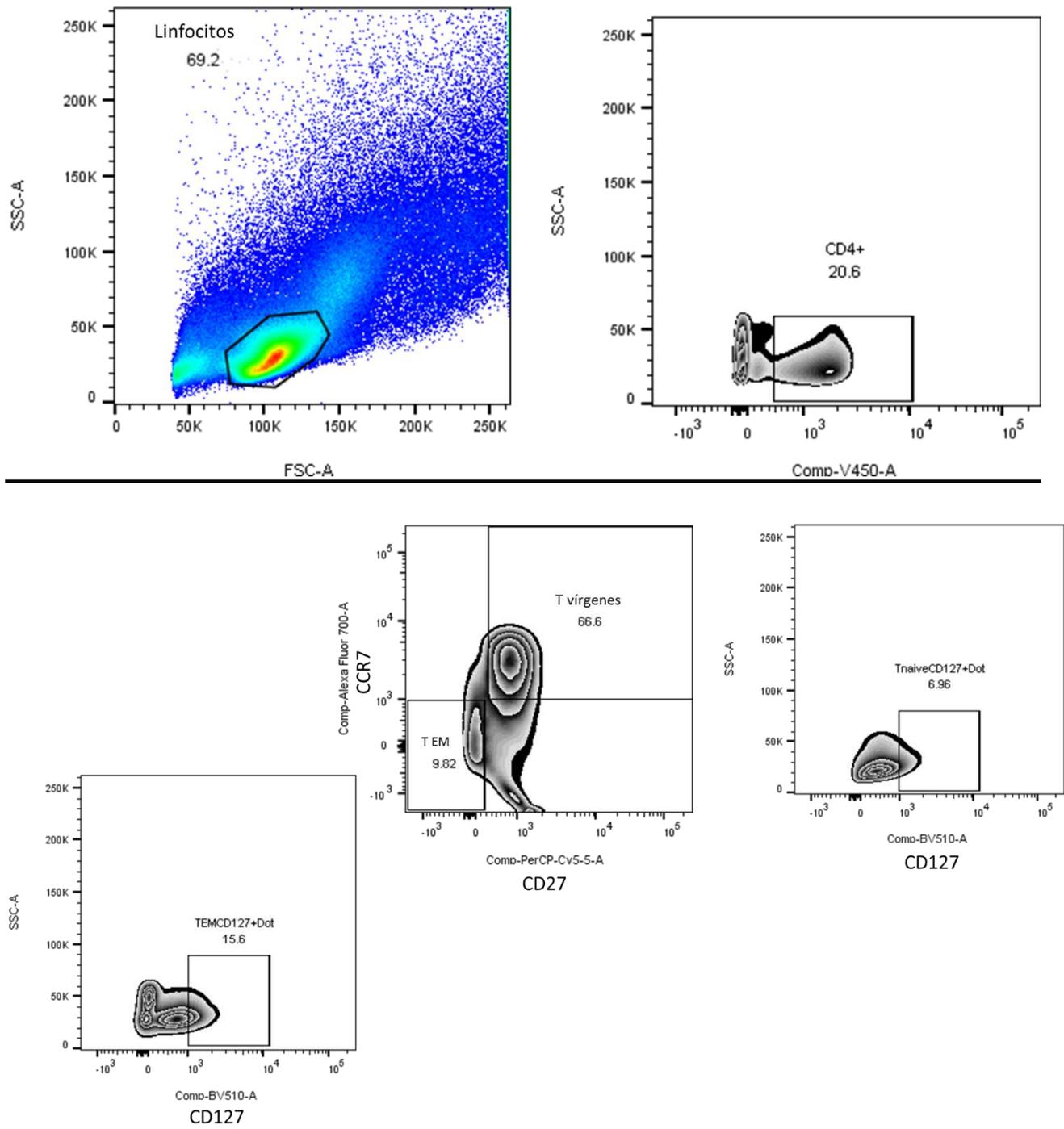
31. Zhang N, Bevan MJ. Tgf-Beta Signaling to T Cells Inhibits Autoimmunity During Lymphopenia-Driven Proliferation. *Nat Immunol* 2012; **13**(7): 667-73.
32. Penhale WJ, Farmer A, McKenna RP, Irvine WJ. Spontaneous Thyroiditis in Thymectomized and Irradiated Wistar Rats. *Clin Exp Immunol* 1973; **15**(2): 225-36.
33. Barrett SP, Toh BH, Alderuccio F, van Driel IR, Gleeson PA. Organ-Specific Autoimmunity Induced by Adult Thymectomy and Cyclophosphamide-Induced Lymphopenia. *Eur J Immunol* 1995; **25**(1): 238-44.
34. Thayer TC, Wong FS. Tracking Immunological Responses of Islet Antigen-Specific T Cells in the Nonobese Diabetic (Nod) Mouse Model of Type 1 Diabetes. *Methods Mol Biol* 2016; **1433**: 127-34.
35. MacMurray AJ, Moralejo DH, Kwitek AE, et al. Lymphopenia in the Bb Rat Model of Type 1 Diabetes Is Due to a Mutation in a Novel Immune-Associated Nucleotide (Ian)-Related Gene. *Genome Res* 2002; **12**(7): 1029-39.
36. Awata T, Guberski DL, Like AA. Genetics of the Bb Rat: Association of Autoimmune Disorders (Diabetes, Insulinitis, and Thyroiditis) with Lymphopenia and Major Histocompatibility Complex Class Ii. *Endocrinology* 1995; **136**(12): 5731-5.
37. Ramanathan S, Poussier P. T Cell Reconstitution of Bb/W Rats after the Initiation of Insulinitis Precipitates the Onset of Diabetes. *J Immunol* 1999; **162**(9): 5134-42.
38. Scheinberg MA, Cathcart ES. B Cell and T Cell Lymphopenia in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Immunol* 1974; **12**(2): 309-14.
39. Vila LM, Alarcon GS, McGwin G, Jr., et al. Systemic Lupus Erythematosus in a Multiethnic Us Cohort, Xxxvii: Association of Lymphopenia with Clinical Manifestations, Serologic Abnormalities, Disease Activity, and Damage Accrual. *Arthritis Rheum* 2006; **55**(5): 799-806.
40. Huang YL, Chung HT, Chang CJ, Yeh KW, Chen LC, Huang JL. Lymphopenia Is a Risk Factor in the Progression of Carotid Intima-Media Thickness in Juvenile-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; **60**(12): 3766-75.
41. Merayo-Chalico J, Gomez-Martin D, Pineirua-Menendez A, Santana-De Anda K, Alcocer-Varela J. Lymphopenia as Risk Factor for Development of Severe Infections in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Case-Control Study. *QJM* 2013; **106**(5): 451-7.
42. Merayo-Chalico J, Demichelis-Gomez R, Rajme-Lopez S, et al. Risk Factors and Clinical Profile of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Systemic Lupus Erythematosus Patients. Is This a Distinctive Clinical Entity in the Thrombotic Microangiopathy Spectrum?: A Case Control Study. *Thromb Res* 2014; **134**(5): 1020-7.
43. Merayo-Chalico J, Apodaca E, Barrera-Vargas A, et al. Clinical Outcomes and Risk Factors for Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome in Systemic Lupus Erythematosus: A Multicentric Case-Control Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; **87**(3): 287-94.
44. Yu HH, Wang LC, Lee JH, Lee CC, Yang YH, Chiang BL. Lymphopenia Is Associated with Neuropsychiatric Manifestations and Disease Activity in Paediatric Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Rheumatology (Oxford)* 2007; **46**(9): 1492-4.
45. Drenkard C, Villa AR, Reyes E, Abello M, Alarcon-Segovia D. Vasculitis in Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* 1997; **6**(3): 235-42.
46. Choojitarom K, Verasertniyom O, Totemchokchayakarn K, Nantiruj K, Sumethkul V, Janwityanujit S. Lupus Nephritis and Raynaud's Phenomenon Are Significant Risk Factors for Vascular Thrombosis in Sle Patients with Positive Antiphospholipid Antibodies. *Clin Rheumatol* 2008; **27**(3): 345-51.
47. Morimoto C, Schlossman SF. Antilymphocyte Antibodies and Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1987; **30**(2): 225-8.
48. Winfield JB, Mimura T. Pathogenetic Significance of Anti-Lymphocyte Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; **63**(1): 13-6.
49. Winfield JB, Fernsten PD, Czyzyk JK. Anti-Lymphocyte Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1997; **108**: 127-35.

50. Long AA, Denburg SD, Carbotte RM, Singal DP, Denburg JA. Serum Lymphocytotoxic Antibodies and Neurocognitive Function in Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1990; **49**(4): 249-53.
51. Magalhaes MB, da Silva LM, Voltarelli JC, Donadi EA, Louzada-Junior P. Lymphocytotoxic Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus Are Associated with Disease Activity Irrespective of the Presence of Neuropsychiatric Manifestations. *Scand J Rheumatol* 2007; **36**(6): 442-7.
52. Ruiz-Arguelles A, Llorente L. The Role of Complement Regulatory Proteins (Cd55 and Cd59) in the Pathogenesis of Autoimmune Hemocytopenias. *Autoimmun Rev* 2007; **6**(3): 155-61.
53. Garcia-Valladares I, Atisha-Fregoso Y, Richaud-Patin Y, et al. Diminished Expression of Complement Regulatory Proteins (Cd55 and Cd59) in Lymphocytes from Systemic Lupus Erythematosus Patients with Lymphopenia. *Lupus* 2006; **15**(9): 600-5.
54. Alegretti AP, Mucenic T, Merzoni J, Faulhaber GA, Silla LM, Xavier RM. Expression of Cd55 and Cd59 on Peripheral Blood Cells from Systemic Lupus Erythematosus (Sle) Patients. *Cell Immunol* 2010; **265**(2): 127-32.
55. Amasaki Y, Kobayashi S, Takeda T, et al. Up-Regulated Expression of Fas Antigen (Cd95) by Peripheral Naive and Memory T Cell Subsets in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (Sle): A Possible Mechanism for Lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 1995; **99**(2): 245-50.
56. Munoz LE, van Bavel C, Franz S, Berden J, Herrmann M, van der Vlag J. Apoptosis in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* 2008; **17**(5): 371-5.
57. Silva LM, Garcia AB, Donadi EA. Increased Lymphocyte Death by Neglect-Apoptosis Is Associated with Lymphopenia and Autoantibodies in Lupus Patients Presenting with Neuropsychiatric Manifestations. *J Neurol* 2002; **249**(8): 1048-54.
58. Badot V, Luijten RK, van Roon JA, et al. Serum Soluble Interleukin 7 Receptor Is Strongly Associated with Lupus Nephritis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2013; **72**(3): 453-6.
59. Chi S, Xue J, Li F, et al. Correlation of Serum Soluble Interleukin-7 Receptor and Anti-C1q Antibody in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Dis* 2016; **2016**: 8252605.
60. Wang XS, Wen PF, Zhang M, et al. Interleukin-7 Receptor Single Nucleotide Polymorphism Rs6897932 (C/T) and the Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *Inflammation* 2014; **37**(2): 615-20.
61. Majdinasab N, Hosseini Behbahani M, Galehdari H, Mohaghegh M. Association of Interleukin 7 Receptor Gene Polymorphism Rs6897932 with Multiple Sclerosis Patients in Khuzestan. *Iran J Neurol* 2014; **13**(3): 168-71.
62. Harrison C. Autoimmune Disease: Targeting Il-7 Reverses Type 1 Diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2012; **11**(8): 599.
63. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; **40**(9): 1725.
64. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the Sledai. A Disease Activity Index for Lupus Patients. The Committee on Prognosis Studies in Sle. *Arthritis Rheum* 1992; **35**(6): 630-40.
65. Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, et al. Positive Effects of Glucocorticoids on T Cell Function by up-Regulation of Il-7 Receptor Alpha. *J Immunol* 2002; **168**(5): 2212-8.
66. Schulze-Koops H. Lymphopenia and Autoimmune Diseases. *Arthritis Res Ther* 2004; **6**(4): 178-80.
67. Kim HR, Hong MS, Dan JM, Kang I. Altered Il-7ralpha Expression with Aging and the Potential Implications of Il-7 Therapy on Cd8+ T-Cell Immune Responses. *Blood* 2006; **107**(7): 2855-62.
68. Gholamin M, Bazi A, Abbaszadegan MR. Idiopathic Lymphocytopenia. *Curr Opin Hematol* 2015; **22**(1): 46-52.
69. Malaspina A, Moir S, Chaitt DG, et al. Idiopathic Cd4+ T Lymphocytopenia Is Associated with Increases in Immature/Transitional B Cells and Serum Levels of Il-7. *Blood* 2007; **109**(5): 2086-8.

70. Puronen CE, Thompson WL, Imamichi H, et al. Decreased Interleukin 7 Responsiveness of T Lymphocytes in Patients with Idiopathic Cd4 Lymphopenia. *J Infect Dis* 2012; **205**(9): 1382-90.
71. Bugault F, Benati D, Mouthon L, et al. Altered Responses to Homeostatic Cytokines in Patients with Idiopathic Cd4 Lymphocytopenia. *PLoS One* 2013; **8**(1): e55570.
72. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity* 2008; **29**(6): 848-62.
73. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human Immune Disorder Arising from Mutation of the Alpha Chain of the Interleukin-2 Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**(7): 3168-71.
74. Grunebaum E, Sharfe N, Roifman CM. Human T Cell Immunodeficiency: When Signal Transduction Goes Wrong. *Immunol Res* 2006; **35**(1-2): 117-26.
75. Kariuki SN, Franek BS, Mikolaitis RA, et al. Promoter Variant of Pik3c3 Is Associated with Autoimmunity against Ro and Sm Epitopes in African-American Lupus Patients. *J Biomed Biotechnol* 2010; **2010**: 826434.
76. Stopkova P, Saito T, Papolos DF, et al. Identification of Pik3c3 Promoter Variant Associated with Bipolar Disorder and Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2004; **55**(10): 981-8.
77. Rudin DO. The Choroid Plexus and System Disease in Mental Illness. Ii. Systemic Lupus Erythematosus: A Combined Transport Dysfunction Model for Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1981; **16**(4): 373-97.
78. Tiosano S, Farhi A, Watad A, et al. Schizophrenia among Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Population-Based Cross-Sectional Study. *Epidemiol Psychiatr Sci* 2016: 1-6.
79. Haas J, Korporal M, Schwarz A, Balint B, Wildemann B. The Interleukin-7 Receptor Alpha Chain Contributes to Altered Homeostasis of Regulatory T Cells in Multiple Sclerosis. *Eur J Immunol* 2011; **41**(3): 845-53.
80. Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, et al. 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**(7): 2120-30.

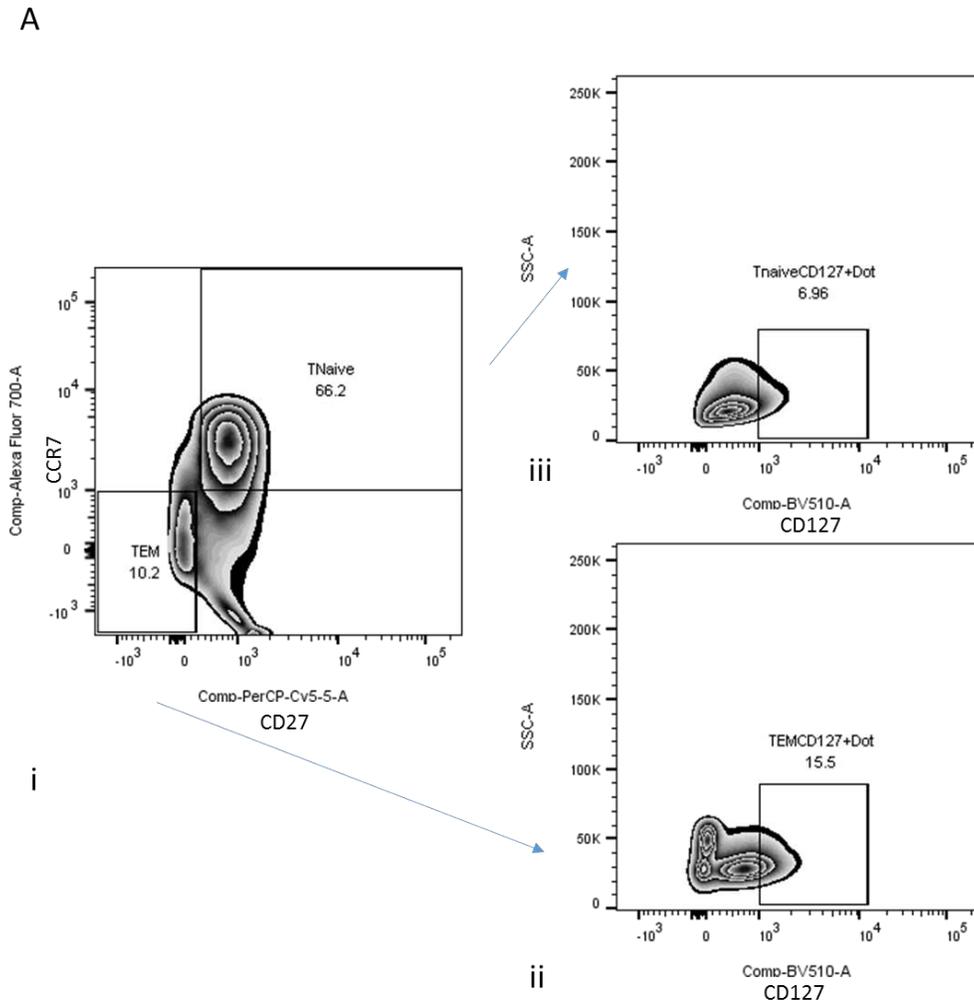
Apéndice I.

Estrategia de selección de región mediante citometría de flujo

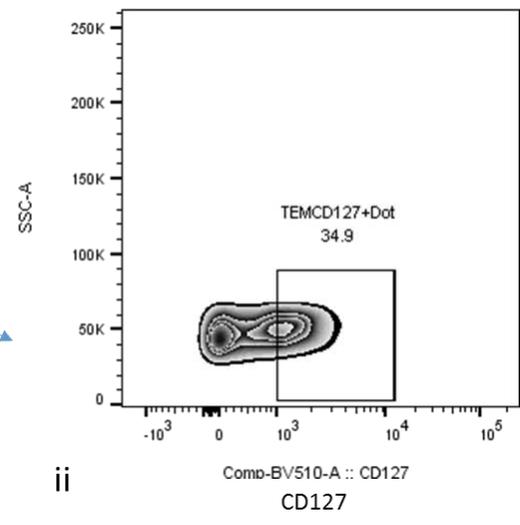
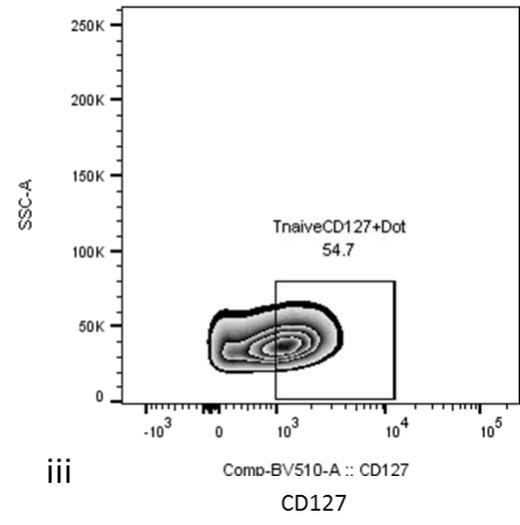
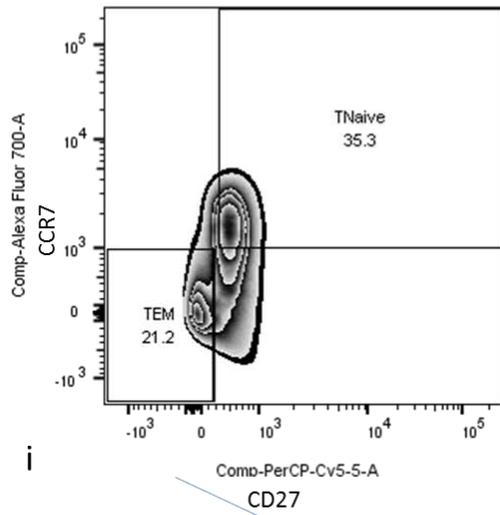


Apéndice II.

Imágenes representativas de citometría de flujo en controles (A), LEG activos con linfopenia (B) y LEG en remisión con linfopenia (C). Las imágenes muestran el porcentaje de células T vírgenes y T efectoras de memoria (i), T efectoras de memorias positivas a CD127 (ii) y T vírgenes positivas a CD 127 (iii)



B



C

