



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Activación constitutiva de STAT3 en células  
CD3<sup>+</sup> periféricas de pacientes con síndrome  
de Sjögren”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:  
**MÉDICO HAYDEÉ LETICIA RAMOS RIVERA**

México, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la asesoría del Dr. Jorge Alcocer Varela.

A mis padres,  
por el apoyo y la gran confianza  
que siempre han depositado en mi.

A mi hermana,  
por recorrer conmigo este largo camino.

A mi asesor, el Dr. Jorge Alcocer,  
por haberme brindado esta oportunidad,  
su confianza y apoyarme en todo el trayecto de este proyecto.

Las siguientes personas intervinieron en el desarrollo de este trabajo. A todas ellas agradezco su ayuda, su constante enseñanza, su amistad, y sobre todo su disposición en todo momento.

Dr. Luis Llorente

Dr. Javier Cabiedes

Dr. Felipe Andrade

Q.C. Yvonne Richaud

Q.F.B. Araceli Martínez

I am in debt with Dr. John O'Shea for all his support throughout and critical discussions. Also to Wendy Watford, a teacher and a friend, who had taught me that the job as a scientist is searching for the truth and as a teacher is to encourage the student development.

Dra. Yvonne Rosenstein, Dr. Roberto González Amaro, Dr. Gustavo Pacheco,  
Drs. Felipe Vega, Natalia Rosales, Roxana del Río, Lilia Mérida, Adriana Mercado,  
Carlos Méndez, Juan Manuel Segovia, Caroline Millet y Jean-Louis Boulay.

Y a todos aquellos que por falta de espacio no menciono,  
pero que han contribuido de igual manera  
a mi crecimiento intelectual y espiritual.

## **JURADO**

**PRESIDENTE: Dra. Edda Lydia Sciutto Conde**

**SECRETARIO: Dr. Jorge Alcocer Varela**

**VOCAL: Dr. Luis Llorente Peters**

**VOCAL: Dra. Marina Macías Silva**

**VOCAL: Dra. Erika Patricia Rendón Huerta**



## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
1. Relación de abreviaturas .....	10
2. Resumen .....	12
3. Introducción	
3.1 Patogenia de las enfermedades difusas del tejido conjuntivo .....	14
3.2 Citocinas .....	19
3.2.2 Citocinas en el síndrome de Sjögren Primario .....	23
3.3 Vía de señalización Jak/Stat .....	25
3.3.1 Transductor y activador de la transcripción-3 (Stat3) .....	31
3.4 Regulación de las citocinas .....	34
3.4.1 Stats e inflamación .....	34
3.4.2 Regulación negativa de la vía Jak/Stat mediante la familia SOCS	35
3.4.3 SOCS3 e inflamación .....	38
4. Hipótesis .....	39
5. Objetivo .....	40
5.1 Objetivos específicos .....	40
6. Diseño Experimental	
6.1 Aislamiento de CMN .....	41
6.2 Detección de proteínas intracelulares por citometría de flujo .....	42
6.3 ELISA para IL-10 .....	43
6.4 Inmunohistoquímica .....	43
7. Resultados .....	46

8. Discusión	.....	56
9. Bibliografía	.....	59
10. artículo publicado	.....	65

## RELACIÓN DE ABREVIACIONES UTILIZADAS

Stats	Transductores de la señal y activadores de la transcripción
Jak	Janus tirosina cinasa
SSP	Síndrome de Sjögren primario
SS	Síndrome de Sjögren
IL	Interleucina
IFN- $\alpha$	del inglés "Interferon alpha"
TGF- $\beta$	del inglés "Transforming growth factor-beta"
IFN- $\gamma$	del inglés "Interferon gamma"
TNF	del inglés "Tumor necrosis factor"
T-bet	Factor de transcripción importante para el desarrollo de células Th1
GATA	Factor de transcripción importante para el desarrollo de células Th2
ROR- $\gamma$ t	del inglés "retinoic acid receptor-related orphan receptor $\gamma$ -T"
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial
AR	Artritis reumatoide
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
CIS	Citocinas-inducibles SH2
SOCS	Supresores de la señalización de citocinas
IL-10hr	Interleucina-10 humana recombinante
HC	Hormona de crecimiento
LIF	del inglés "Leukemia inhibitory factor"
BAFF	del inglés "B cell activating factor belonging to the TNF family"

JH	del inglés “Jak homology”
SH	del inglés “Src-homology”
FERM	del inglés “four-point-one, ezrin, radixin, moesin”
GAS	del inglés “gamma activation sequence”
CMN	Células mononucleares
EDTA	Ácido etildiaminotetraácetico
SBF	Suero bovino fetal
Ac	Anticuerpo
pSta3	Stat3 fosforilado
pSta1	Stat1 fosforilado
pJak1	Jak1 fosforilado
pTyk2	Tyk2 fosforilado
IF	Índice de fluorescencia
TBS	Amortiguador de tris
TBS-T	Amortiguador de tris con Tween
DAB	Diaminobenzidina
FA	Fosfatasa alcalina

## RESUMEN

**Objetivo.** Los transductores y activadores de la transcripción (Stats) son importantes mediadores en la señalización de citocinas. Se ha reportado una activación constitutiva de estas proteínas, específicamente de Stat3 en varias patologías. El síndrome de Sjögren primario (SSP), es una enfermedad autoinmune, asociada a la sobreproducción de citocinas que activan a los Stats, como la IL-10, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si existe una activación constitutiva de Stat3 en pacientes con SSP.

**Metodología.** Se estudiaron 12 pacientes y 12 individuos aparentemente sanos, todos del sexo femenino. Se aislaron células mononucleares (CMN) por gradiente de densidad, mismas que fueron incubadas con o sin IL-10 humana recombinante (IL-10hr). Se realizó tinción de superficie con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD19 marcados con Cy5. Mediante citometría de flujo se analizó la expresión y activación de las proteínas Janus tirosina cinasas (Jaks) y Stats. Mediante inmunohistoquímica se estudio la expresión de Stat3 fosforilado (pStat3) en tejido de glándula salival de 6 pacientes y de 5 donadores sanos.

**Resultados.** Por citometría de flujo observamos una activación constitutiva de Stat3 en células T en los pacientes comparado con los individuos sanos, no así en las células B. Al analizar la expresión de Jak1, Tyk2, Stat1 y su forma fosforilada en ambas poblaciones, no se encontró diferencias entre los dos grupos de estudio. Por inmunohistoquímica se observó una mayor activación de Stat3 en las células epiteliales ductales y mononucleares del infiltrado en los pacientes al compararlo con los individuos sanos.

**Conclusiones.** Los datos sugieren una activación constitutiva de Stat3 en células T de sangre periférica en pacientes con SSP, lo que al parecer es independiente de la vía de señalización de la IL-10. También se identificó dicha activación constitutiva en el tejido blanco (glándula salival) asociado a células epiteliales ductales y linfocitos. Una posible explicación sería que exista un entrecruzamiento entre diferentes vías de señalización intracelular, lo que lleva a la activación *in vivo* de Stat3 a nivel sistémico y de daño a órgano blanco.

## ABSTRACT

**Objective.** Signal transducers and activators of transcription (Stats) are critical mediators of cytokine signaling. Constitutive activation of Stats, especially Stat3 has been reported in several diseases. Primary Sjögren's Syndrome (pSS) is associated with overproduction of cytokines such as IL-10, although the mechanism by which this occurs is unknown. Since Stat3 is a potent inducer of IL-10, this study is focused to determine the pattern of Stat3 activation in peripheral lymphocytes from patients with pSS.

**Methods.** Twelve pSS patients and twelve healthy age-matched control subjects were studied. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by gradient centrifugation. Phosphorylated Stat3 (pStat3) as well as Stat3 expression were determined by flow cytometry in gated CD3<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocytes. Similarly, pJak1 and pTyk2 were also determined in gated CD3<sup>+</sup> lymphocytes.

**Results.** Although expression of Stat3 protein is similar among controls and pSS patients, we found that Stat3 is constitutively activated in CD3<sup>+</sup> lymphocytes from pSS patients. Interestingly, neither Jak1 nor Tyk2 (the upstream activators of Stat3) were activated in pSS CD3<sup>+</sup> lymphocytes, suggesting that the constitutive activation of Stat3 observed in pSS patients may not depend on cytokine stimulation but instead, it might be the result of an abnormal inactivation of pStat3.

**Conclusion.** These data provide evidence of abnormal Stat3 signaling in T cells from pSS patients.

## INTRODUCCIÓN

### **3.1 PATOGENIA DE LAS ENFERMEDADES DIFUSAS DEL TEJIDO CONJUNTIVO.**

Las enfermedades difusas del tejido conjuntivo, también llamadas de la colágena, son enfermedades generalizadas, de base autoinmune, y que comparten entre sí diferentes manifestaciones clínicas y serológicas. La etiología de estas enfermedades se desconoce, pero los mecanismos que dan lugar a la inflamación y daño de las articulaciones y de otros tejidos, parecen tener un origen multifactorial (1).

Durante los últimos 25 años, se ha propuesto que los mecanismos de inmunorregulación se encuentran afectados en diferente forma en cada una de estas enfermedades. Se han identificado varias alteraciones de la regulación inmune que han contribuido al entendimiento de la patogenia de las mismas y han abierto nuevos caminos a su tratamiento, aunque todavía queda un camino largo por recorrer dado que no se cuenta con tratamientos totalmente curativos (1). Dentro de este rubro de enfermedades autoinmunes se ubica al síndrome de Sjögren.

El síndrome de Sjögren (SS), es una enfermedad crónica de base autoinmune, que presenta un infiltrado linfocitario de las glándulas exócrinas y del epitelio en múltiples sitios. La infiltración en las glándulas salivales y lagrimales resulta en queratoconjuntivitis sicca (ojo seco) y xerostomía (disfunción salival) (2). El SS tiene una prevalencia de 0.5% en la población, y afecta principalmente a mujeres de edades entre 40-50 años (con una relación mujeres: hombres de 9:1) (3). En el

cuadro 1 se muestran los criterios europeos revisados en el 2002 para el diagnóstico de SS (4).

### **Cuadro 1. Criterios de clasificación para el síndrome de Sjögren.**

<p>I. Síntomas oculares: respuesta afirmativa por lo menos a alguna de las siguientes preguntas:</p> <p>a) presenta molestia persistente o problemas de ojo seco en los últimos 3 meses? b) tiene sensación recurrente de arena o tierra en los ojos? c) utiliza sustitutos de lágrimas más de 3 veces al día?</p>
<p>II. Síntomas orales: respuesta afirmativa por lo menos a alguna de las siguientes preguntas:</p> <p>a) tiene sensación de boca seca por más de 3 meses? b) presenta inflamación recurrente o persistente de glándula salival? c) ingiere líquidos de manera frecuente para poder deglutir los alimentos sólidos?</p>
<p>III. Signos oculares: evidencia objetiva de alteración ocular definida como resultado positivo a alguna de estas dos pruebas:</p> <p>a) prueba de Schirmer, se lleva a cabo sin anestesia (<math>\leq 5</math> mm en 5 min.) b) puntuación de la prueba rosa de bengala u otra puntuación de ojo seco (<math>\geq 4</math> de acuerdo al sistema de puntuación de van Bijsterveld).</p>
<p>IV. Histopatología. Presencia de sialodentitis focal linfocitaria en glándula salival menor, evaluado por un experto, con una puntuación <math>\geq 1</math> por <math>\text{mm}^2</math> del tejido glandular.</p>
<p>V. Daño en glándula salival evaluado mediante la positividad a alguna de estas pruebas:</p> <p>a) flujo salival menor o igual a 1.5 ml en 15 minutos. b) presencia de sialectasias evaluado por sialografía parotídea. c) gamagrama salival que muestre retardo en la ingesta, disminución en la concentración y/o retraso en la eliminación del medio por la glándula.</p>
<p>VI. Presencia en suero de alguno de los siguientes anticuerpos:</p> <p>a) anticuerpos anti-Ro (SSA) o antígenos anti-La (SSB), o ambos.</p>



El SS se puede presentar sólo (**SS Primario, SSP**) o en asociación con otra enfermedad del tejido conectivo tal como lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide (**SS Secundario**) (2). Algunos pacientes presentan manifestaciones sistémicas extraglandulares tales como alteraciones neurológicas, gastrointestinales, pulmonares, renales, dermatológicas y hematológicas, entre otras (2). Dentro de las manifestaciones extraglandulares, el linfoma es una de las complicaciones más importantes en el SS. Se sabe que aproximadamente 4% de los pacientes con SSP desarrolla linfoma (5).

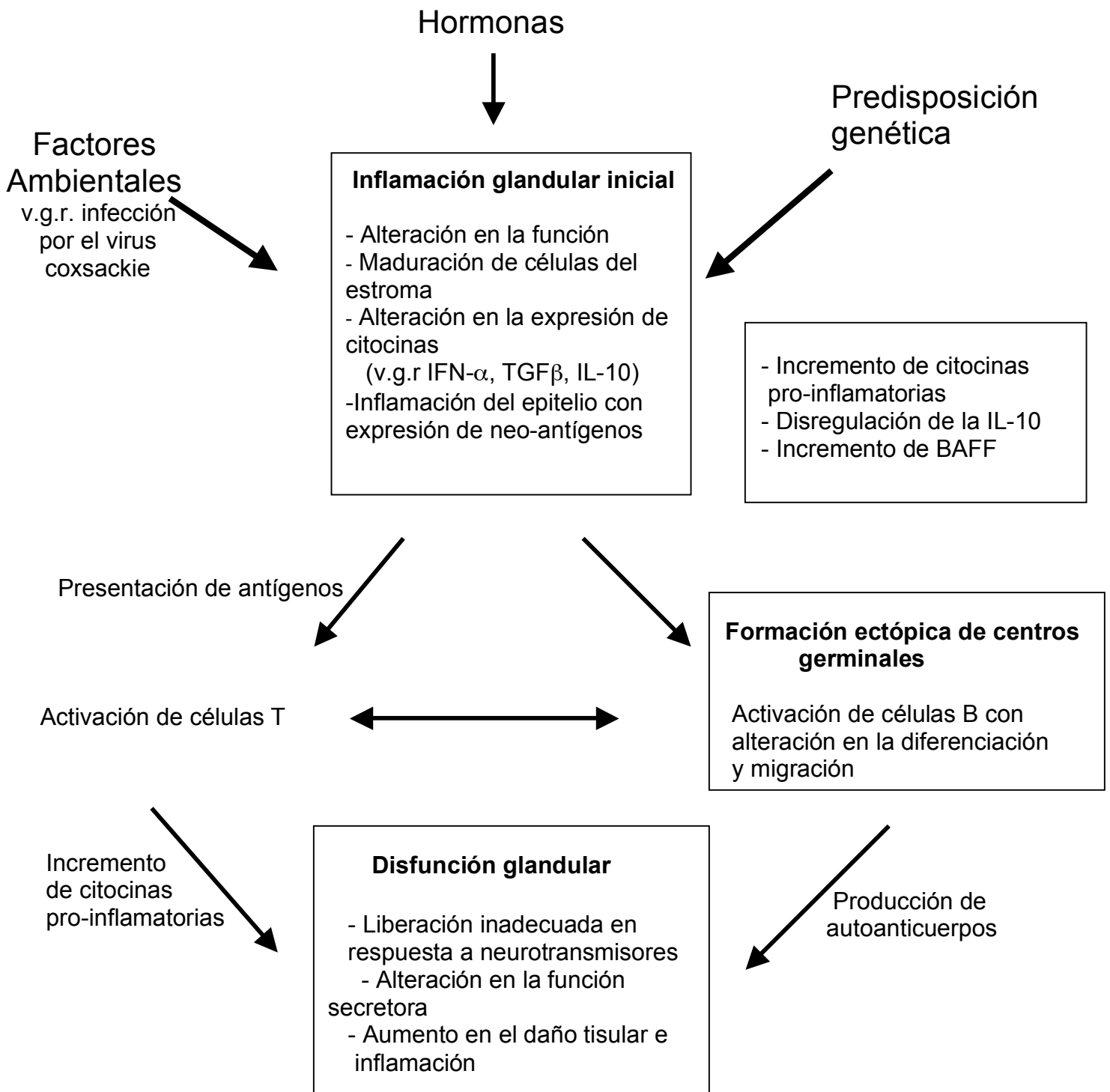
Al igual que en otras enfermedades reumáticas la etiología se desconoce. Sin embargo, las infecciones virales han sido implicadas en el desarrollo de la enfermedad. Esta asociación se apoya en que las glándulas salivales son el lugar de latencia de algunos virus, entre estos se incluyen: virus Epstein-Barr, virus de la hepatitis C y retrovirus (6, 7). También los estudios por serología han demostrado la asociación del SSP con los antígenos leucocitarios humanos (HLA) -DR3, DR2, DR5 y DRw53 (8). Font y colaboradores (9) han descrito una distribución anormal de haplotipos en el promotor de la IL-10 (predominancia del haplotipo GCC) en pacientes con SSP.

Dentro de las alteraciones inmunológicas observadas en los pacientes con SSP se incluyen *i*) una respuesta inmune celular anormal, que se manifiesta como un infiltrado inflamatorio, compuesto en su mayoría por linfocitos T (CD4<sup>+</sup>) activados, aunque también puede haber linfocitos B (10, 11), y *ii*) hiperactividad oligoclonal de las células B que se traduce en la sobreproducción de gammaglobulinas, autoanticuerpos (factor reumatoide, anti-Ro y anti-La) y complejos inmunes (12).

En la actualidad el tratamiento del SSP es exclusivamente sintomático, incluyendo lágrimas y saliva artificial (3, 13). Por ello, es necesario comprender la fisiopatogenia de la enfermedad y así poder lograr diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

Además, con base a la dicotomía existente entre células de ayuda Th1 y Th2, T reguladoras (Treg) y más recientemente las Th17, cada una con un patrón de producción de citocinas diferente, se ha hecho patente la importante participación de éstas en la regulación de las respuestas observadas en el SSP, así como en otras enfermedades autoinmunes y no-autoinmunes.

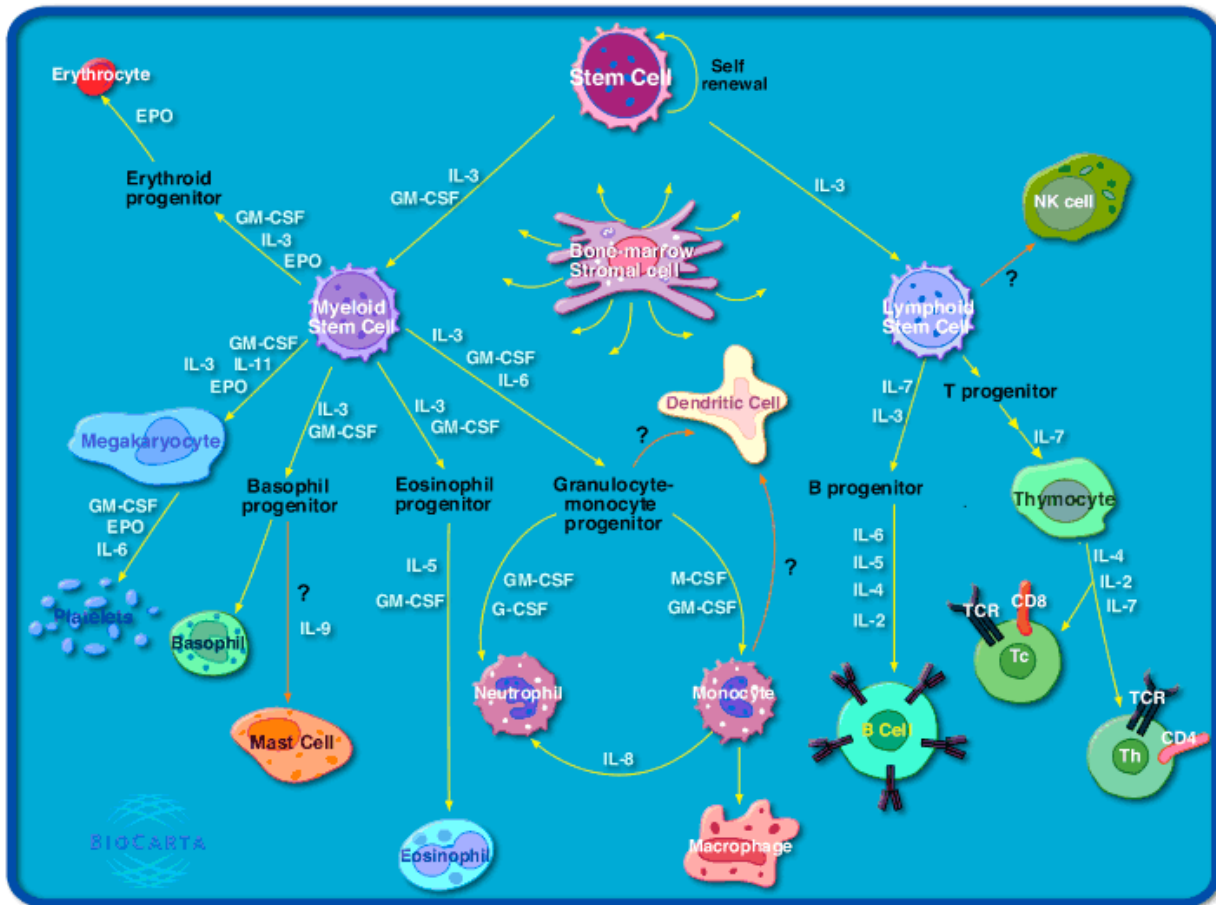
El siguiente esquema fue adaptado de una revisión de Hansen *et.al.* (14), en el cual se sugieren los posibles mecanismos que participan en la inmunopatogénesis del SSP.



### **3.2 CITOCINAS.**

Las citocinas son un grupo de mediadores solubles constituidos por proteínas glucosiladas de bajo peso molecular (menos de 80 kDa), encargadas de la comunicación intercelular, principalmente entre las células que componen el sistema inmunológico. Los eventos en los que están involucradas ocurren durante el inicio y a todo lo largo de una reacción inmune, aunque también participan en el desarrollo de las células hematopoyéticas (Figura 1). Las citocinas abarcan un amplio espectro de reguladores de proteínas celulares y han sido clasificadas en familias, dentro de las cuales están: interleucinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), hemopoyetinas y quimiocinas. Estas se relacionan estructuralmente, además de modular inmunidad e inflamación. Las citocinas generalmente actúan a corta distancia de manera paracrina o autocrina, a diferencia de las hormonas cuya acción es endocrina. Primeramente interactúan con receptores de alta afinidad localizados en la superficie de las células, y posteriormente, regulan la transcripción de varios genes celulares mediante segundas señales, que conducen a cambios en el comportamiento celular (15).

Figura 1. Citocinas y hematopoesis.

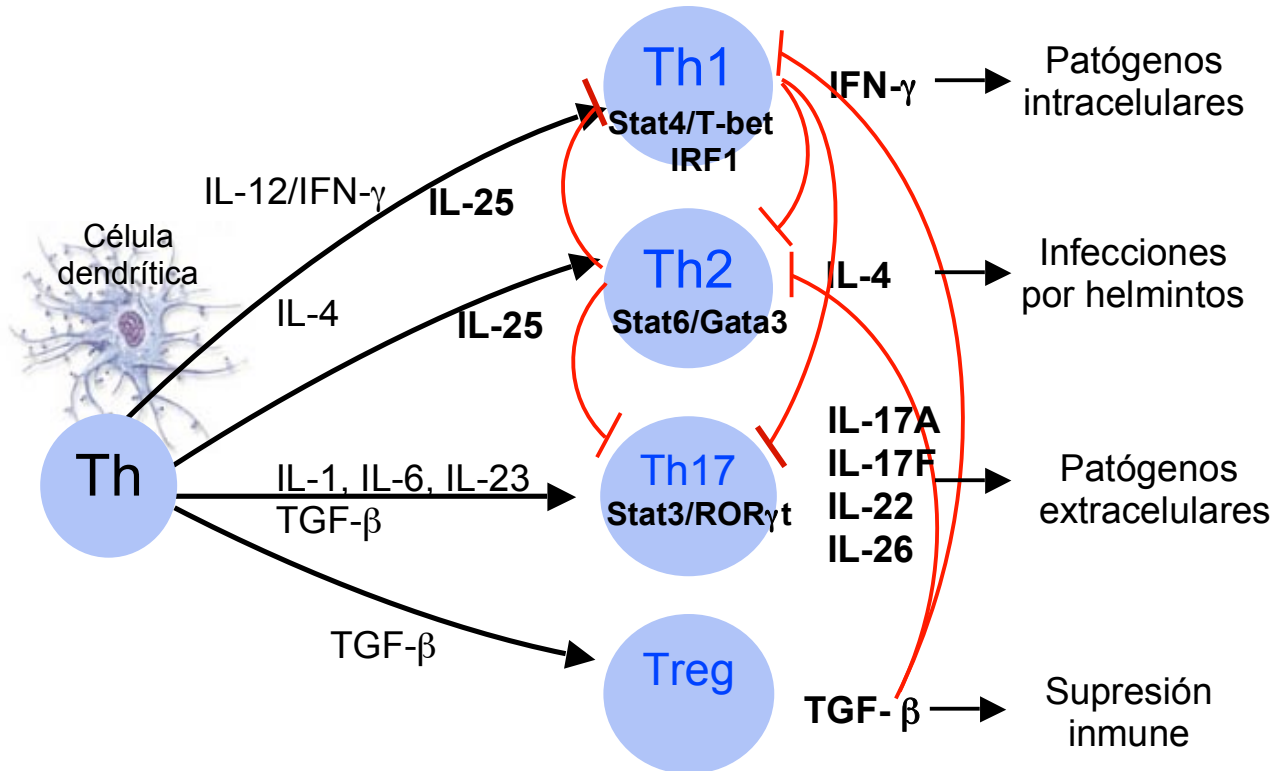


[http://www.biocarta.com/pathfiles/h\\_stemPathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_stemPathway.asp)

En respuesta a varios agentes infecciosos, el sistema inmune adaptativo genera distintas respuestas, las cuales son en parte reguladas por el patrón de citocinas secretadas por las células T efectoras. Hasta hace algunos años se conocía dos patrones de respuesta con base en la secreción de citocinas en los linfocitos ayudadores T CD4<sup>+</sup>: células Th1 que secretan IFN- $\gamma$  y células Th2 que secretan IL-4, IL-5, e IL-13, entre otras (16, 17). Las células Th1 son esenciales en el control de infecciones intracelulares, mientras que las células Th2 son importantes en

infecciones por helmintos. Este tipo de respuestas también se asocian a la patogénesis de la enfermedad mediada por inmunidad. Recientemente se ha descrito la IL-17, y la familia que la compone (IL-17A e IL-17F), como una citocina que juega un papel importante en la defensa contra bacterias extracelulares. Así mismo, la IL-17 se ha encontrado sobre-expresada en una variedad de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias (18-20).

En el siguiente esquema (Figura 2) se resumen las posibles diferenciaciones de la célula T y la importancia del tipo de respuesta originada con base en dicha diferenciación.



Esquema adaptado de Zhi Chen y Arian Laurence. Nature Immunology 2007, 8:903-905.

### **3.2.2 CITOCINAS EN SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO.**

Existen muchas evidencias que sugieren que las citocinas juegan un papel importante en la patogénesis del síndrome de Sjögren, al incrementar y promover el proceso autoinmune celular y humoral (21-29).

De hecho, a algunas citocinas tipo Th1, involucradas en la patogénesis del SSP, también se les ha atribuido una participación en otras enfermedades autoinmunes (24, 25), por ejemplo los niveles altos de IL-18 en plasma han sido correlacionados con altos niveles de IgG1 tanto en pacientes con SSP como en pacientes con artritis reumatoide (24). Además, se ha demostrado que la IL-18 esta involucrada en la señalización en el ámbito local que conduce a la inflamación en las glándulas (25). Otro ejemplo incluye la expresión de la IL-12. En un estudio realizado en ratones MRL/lpr, se detectó la expresión local del RNAm de la IL-12 en una fase temprana pro-inflamatoria de las lesiones autoinmunes (30). La expresión del transcrito de ésta citocina también se observó en una fase temprana pro-inflamatoria de la sialoadenitis autoinmune, lo que sugiere que esta molécula desempeña un papel importante en la destrucción de las glándulas salivales durante el desarrollo de una respuesta autoinmune (31). El grupo de Horiuchi confirmó la importancia de esta interleucina, al estudiar la relación de la IL-12 y el virus del Epstein Barr (EBV), y al encontrar que la producción de la IL-12 aumentó durante la activación del virus *in vitro*, de tal modo que esta contribuye al patrón de respuesta tipo Th1 en el SSP. También se ha descrito que las citocinas IL-2, IL-3, IL-6, IL-12 así como la IL-10 entre otras, intervienen en la biopatología de las alteraciones linfoproliferativas de las células B (32).



Otra citocina con importante participación en la fisiopatogenia del SSP es la IL-10. La IL-10 es una citocina pleiotrópica que regula una gran variedad de funciones de las células hematopoiéticas. Su principal función es anti-inflamatoria, por lo que la IL-10 facilita la eliminación de organismos infecciosos con mínimo daño al tejido del huésped. Además, la IL-10 juega un papel importante en la tolerancia inmune, en el desarrollo de las células T y de las células dendríticas, así como en el crecimiento y diferenciación de células B (33). Dentro de las vías de señalización que utiliza la IL-10 que han sido mejor caracterizadas se ubica a la vía de Jak/Stat, cuya información se amplía en otro apartado. Brevemente, la interacción de la IL-10 con su receptor (IL-10R) activa a Jak1 y a Tyk2 (34), las cuales se encuentran constitutivamente asociadas con los receptores IL-10R1 y IL-10R2, respectivamente (35). La IL-10 induce en macrófagos la fosforilación en tirosina y la activación de los factores de transcripción Stat3 y Stat1, y en no-macrófagos la activación de Stat5 (34, 36-38).

A pesar de que la acción principal de la IL-10 es anti-inflamatoria, diversos estudios la han implicado en la patogénesis del SSP. Se han reportado altos niveles de IL-10 tanto en plasma como en saliva, y éstos han sido correlacionados con la gravedad de la enfermedad (21, 26, 39). De hecho Fox y su grupo (22) han demostrado claramente que las células T CD4<sup>+</sup> de glándulas salivales de pacientes con SSP producen 40 veces más IL-10, IL-2 e IFN- $\gamma$  que las células T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica. Así mismo, en los ratones transgénicos para IL-10 se ha demostrado que el incremento en la expresión de IL-10 tanto en glándulas salivales como lagrimales contribuye a la destrucción de las mismas por una mayor infiltración de células T CD4<sup>+</sup> (40, 41). Otras evidencias, también en el

modelo murino de SSP, han demostrado que la liberación de IL-10 mediante transferencia de genes causa: i) una disminución importante en la inflamación glandular, así como ii) la disminución de los niveles de IL-10 en plasma (27, 28). Esto refleja la complejidad de la participación de la IL-10 en la patogenia del SSP, así como en otras enfermedades autoinmunes.

Los estudios realizados en glándulas salivales de pacientes con SSP, específicamente análisis de la expresión de genes importantes en la producción de citocinas, han demostrado la importancia de los interferones tipo I y II en la perpetuación de la respuesta inmune (42, 43). También se ha descrito que las citocinas como la IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  se transcriben en altas cantidades en las células epiteliales de pacientes con SSP (44), y que las células mononucleares de estos pacientes también producen en el ámbito local IL-6 e IL-10, mismas que, como se mencionó previamente, contribuyen a la destrucción de las glándulas exócrinas en el SSP (45).

### **3.3 VÍA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT.**

Durante los últimos 15 años se han descrito algunas de las moléculas mediante las cuales las citocinas tipo I y tipo II ejercen sus funciones, entre ellas se ubica a las proteínas que componen la vía Jak/Stat (tabla 1)(46). De hecho varias de las citocinas involucradas en la patogenia del SSP señalizan a través de la vía Jak/Stat. Como se mencionó previamente, el mecanismo de señalización inicia con la unión a su receptor, lo que desencadena una cascada de eventos que llevan a la fosforilación de las proteínas Janus tirosina cinasas (Jaks) y a los transductores de la señal y activadores de la transcripción (Stats) (Figura 3). La

familia de las Jaks, está formada por cuatro proteínas citoplásmicas denominadas Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2. El peso molecular varía entre 120-130 kDa (1000 a.á.). La expresión de Jak1/Jak4 y Tyk2 es ubicua, mientras que Jak3 se expresa en células NK y timocitos (47). En la figura 4 se muestra la estructura de las proteínas Jaks, la cual se compone de 7 dominios conservados denominados JH1-JH7. La región carboxilo-terminal es el dominio catalítico, éste incluye dos dominios: dominio de tirosina cinasa (JH1) y otro de pseudocinasa (JH2). La región amino-terminal (JH3-JH7) esta constituida por un dominio denominado FERM, este dominio media la unión de la citocina con su receptor. Se sabe que ambos dominios FERM y el de pseudocinasa regulan la actividad catalítica (47, 48).

Los Stats son 7 proteínas (Stat 1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6) que se encuentran inactivas en el citoplasma y son a su vez substratos de las Jaks. Los Stats una vez activados, migran hacia el núcleo e inducen la transcripción de genes de moléculas que participan en diversos procesos celulares, tales como sobrevivencia, proliferación, diferenciación y apoptosis (49, 50).

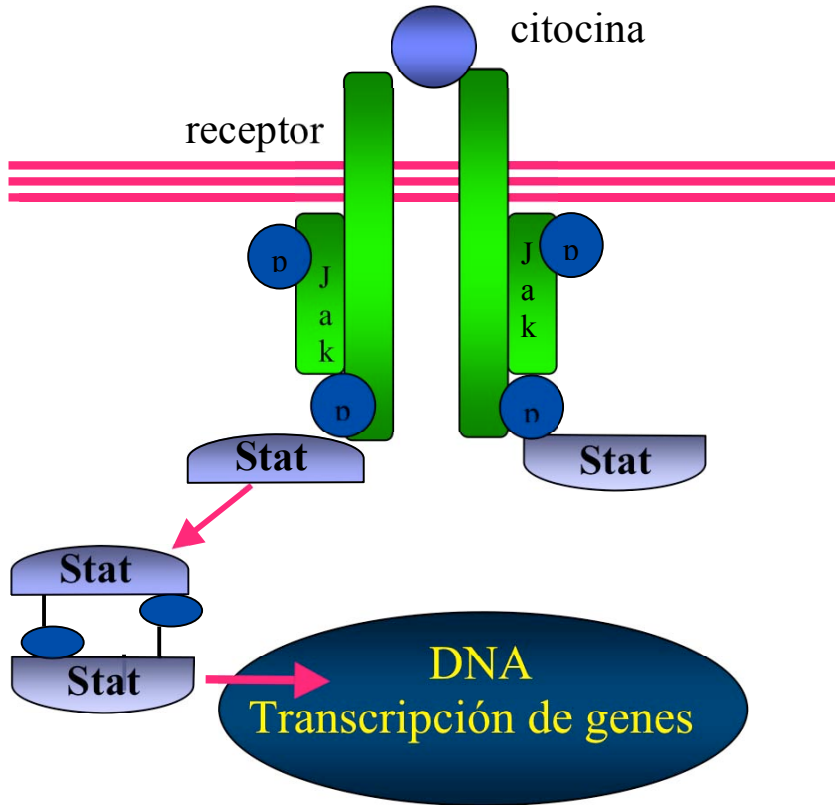
En la figura 5 se muestra la estructura de los Stats, dicha estructura constituye 5 dominios conservados: dominio amino-terminal, "coiled-coil", dominio de unión al DNA, dominio SH2 y el dominio de activación transcripcional (TAD). En la región carboxilo-terminal se encuentran aproximadamente 125 aminoácidos bien conservados, se sabe que ésta porción contribuye a la unión al DNA y también regula la migración del Stat al núcleo. El dominio "coiled-coil" se asocia con varias moléculas importantes en modificar la regulación, tales como IRF9 (del inglés "Interferon regulatory factor"). En la región carboxilo-terminal se localiza el dominio de unión al DNA, éste reconoce miembros de la familia GAS (del inglés

“Interferon-gamma-activated site”) y también se ha asociado con la migración del Stat al núcleo. El dominio adjunto denominado “linker” es importante para garantizar la unión al DNA. El dominio SH2 media el reclutamiento del receptor específico y la dimerización del Stat. El último dominio es de activación transcripcional (TAD) (47, 48).

**Tabla I. Jaks y Stats activados por citocinas.**

<b>Citocinas tipo I</b>	<b>Jaks</b>	<b>Stats</b>
1. Citocinas que comparten el receptor $\gamma$ c:		
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	Jak1, Jak3	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-4	Jak1, Jak3	Stat6
IL-13	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat6
2. Citocinas que comparten el receptor $\beta$ c:		
IL-2, IL-5, GM-CSF	Jak2	Stat5a, Stat5b
3. Citocinas que comparten el receptor gp130:		
IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1	Jak1, Jak2	Stat3, Stat1
NNT-1/BSF-3	Jak1, Jak2	Stat3
G-CSF	Jak2	Stat3
Leptina	Jak2, Tyk2	Stat4
IL-12	?	Stat4
IL-23		
4. Citocinas con receptores homodiméricos:		
hormona de crecimiento	Jak2	Stat5a, Stat5b, Stat3
prolactina	Jak2	Stat5a, Stat5b
eritropoyetina	Jak2	Stat5a, Stat5b
trombopoietina	Jak2	Stat5a, Stat5b
<b>Citocinas tipo II</b>		
Interferon $\alpha/\beta$	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat2
Interferon $\gamma$	Jak1, Jak2	Stat1
IL-10	Jak1, Tyk2	Stat3
IL-19	?	?
IL-20	?	Stat3
IL-22	?	Stat3, Stat5
IL-24	?	Stat3

Figura 3. Vía de señalización de Jak/Stat.




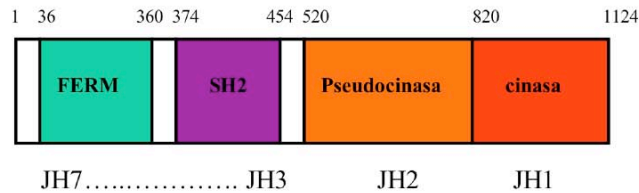
 = fosforilación en residuos de tirosina o serina.

Figura 4 y 5. Estructura de los Jaks y Stats.

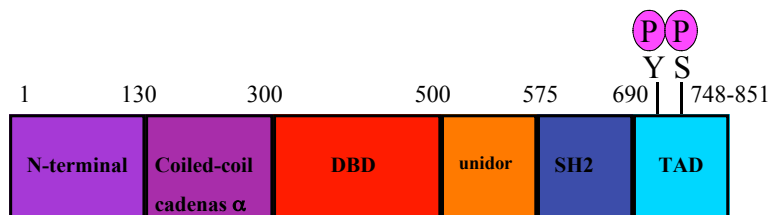
### Estructura de Jak



**FERM.** media la interacción del receptor  
(homología a la banda 4.1, ezrin, radixin / moesin)

**Pseudocinasa.** regula la actividad catalítica con FERM  
funciones reguladoras esenciales

### Estructura de STAT



**Coiled-coil:** involucrado en la interacción proteína-proteína

**DBD :** dominio de unión al DNA

**SH2 :** esencial para la activación y función de STAT

**TAD :** dominio de activación transcripcional

Figuras 3, 4 y 5 son una adaptación de la revisión por O'Shea J.J. et.al. publicado en *Cell* 2002, 109:S121-S-131.

### **3.3.1 Transductor y activador de la transcripción-3 (Stat3).**

Stat3 fue inicialmente descrito como un factor de respuesta de fase aguda (del inglés acute-phase response factor [APRF]), por su capacidad de unirse y activar un elemento del promotor (“enhancer”) de genes de fase aguda (conocidos como elemento de respuesta de fase aguda) en hepatocitos estimulados con IL-6 (51, 52).

Estructuralmente el Stat3 es similar a los otros Stats, tiene una región conservada amino-terminal involucrada en tetramerización, un dominio de unión al DNA, un dominio SH2 importante en el reclutamiento del receptor así como la dimerización del Stat y un dominio de transactivación carboxi-terminal. Al igual que los otros Stats, Stat3 es activado por fosforilación en tirosina (Y705) en la región carboxi-terminal y fosforilación en serina (S727) dentro del dominio de transactivación. La fosforilación en tirosina como respuesta a la estimulación por citocinas es mediada por una Janus cinasa (Jak1) y se requiere para la dimerización de Stat3, su translocación al núcleo y su unión al DNA (53).

El Stat3 se caracteriza por su capacidad de activar diferentes genes en diferentes tipos celulares (53). Dentro de las citocinas con capacidad de activar Stat3 se incluye: a los miembros de la familia de la IL-6, leptina, IL-12, interferones, IL-10, factor estimulador de granulocitos (G-CSF), factores de crecimiento y a oncogenes; la gran variedad de citocinas con capacidad de activar Stat3, muestra la complejidad de dicho factor.

Los ratones deficientes del gen de Stat3 son embríonicamente letales. Se piensa que la muerte del embrión ocurre por una insuficiencia nutricional (54). Mediante el uso de animales condicionales deficientes de Stat3 en diferentes tipos celulares,



se ha entendido mejor la función de este factor en diversos tejidos. Con relación al sistema inmune y sus funciones inflamatorias, la deficiencia de Stat3 en células epiteliales del timo causa una inadecuada supervivencia de timocitos (55). Los efectos de la IL-6 son pleiotrópicos, incluyendo la estimulación de la supervivencia de células T (56). Dada la importancia de Stat3 en la señalización a través de IL-6 es evidente que hay una alteración en la supervivencia de células T mediada por IL-6 (57). La deficiencia de Stat3 en células presentadoras de antígenos interrumpe la tolerancia de la célula T (58), mientras que en granulocitos, la deficiencia lleva a una excesiva proliferación en respuesta al factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (59) .

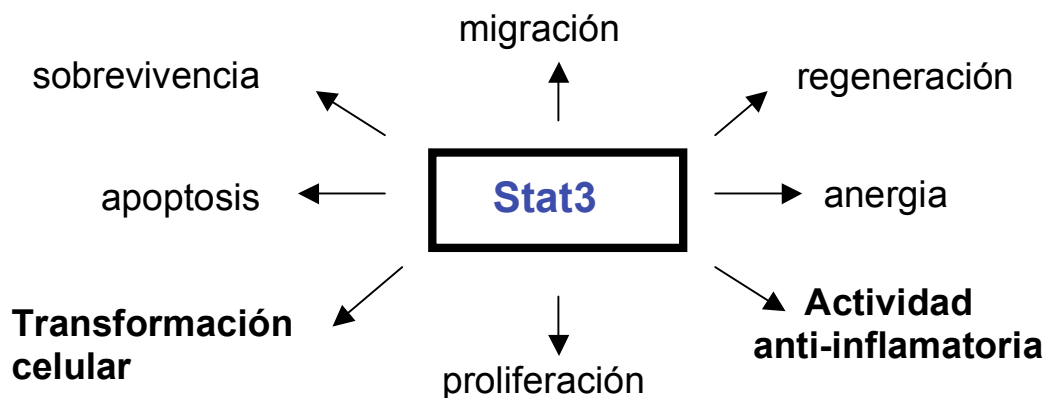
Se ha descrito la participación de Stat3 en la inducción de genes inflamatorios en el hígado (60), aunque también media las funciones anti-inflamatorias de la IL-10 en macrófagos, donde la activación persistente lleva a una inflamación intestinal crónica (61, 62).

Estudios recientes han identificado a Stat3 como una molécula que juega un papel clave en mediar inmunosupresión inducida por tumorigenesis. Se sabe que Stat3 también tiene la capacidad de transducir señales de varias proteínas oncogénicas (63-65), y que no es solamente un potente regulador negativo de una respuesta Th1 que media inflamación, sino que también es un importante activador de varios genes indispensables para la inmunosupresión (61, 65). Se ha descrito que Stat3 y Stat5 se encuentran frecuentemente hiperactivados en tumores sólidos y en enfermedades hematológicas malignas (65). La activación constitutiva de Stat3 puede ser propagada en parte por factores reguladores de Stat3 tales como la IL-10 y el factor de crecimiento vascular endotelial (del inglés

VEGF), a partir de células tumorales hacia una diversidad de células del sistema inmune. Esto media una intercomunicación entre ambas, lo que genera inmunosupresión involucrando una respuesta inmune inata y adaptativa (66). Es evidente que el Stat3 es un factor de transcripción con múltiples funciones (Figura 6) en diferentes células (53, 67) reflejo de su importancia y participación en diferentes sistemas.

Dado que las citocinas juegan un papel fundamental en la patogenia del SSP, así como de otras enfermedades reumáticas, diseccionar algunas de estas vías es indispensable para entender mejor la enfermedad y sugerir nuevas alternativas de tratamiento.

Figura 6. Funciones de Stat3.



### **3.4 REGULACIÓN DE LAS CITOCINAS.**

En la respuesta inflamatoria participa la liberación de mediadores y el reclutamiento de leucocitos circulantes, los cuales son activados en el sitio de inflamación y así mismo liberan otros mediadores. En muchos casos, la respuesta inflamatoria se resuelve mediante la liberación de mediadores endógenos anti-inflamatorios (citocinas anti-inflamatorias), así como la acumulación de factores intracelulares reguladores negativos. Por lo tanto, las células inflamatorias son eliminadas en el momento adecuado. Sin embargo, la acumulación y la activación persistente de leucocitos son factores críticos en la inflamación crónica, lo que sugiere una disfunción de los mecanismos de regulación negativa (15). Actualmente existen estudios clínicos para el tratamiento de la inflamación, dicho tratamiento esta enfocado a la inhibición en la producción de mediadores pro-inflamatorios y en la supresión de la iniciación de la respuesta inflamatoria, por ejemplo la supresión de las vías de señalización positivas para citocinas pro-inflamatorias. Es evidente, que el entendimiento sobre los mecanismos mediante los cuales la respuesta inflamatoria se resuelve, contribuirá a proveer nuevas alternativas en el tratamiento de la inflamación crónica, característica de varias enfermedades autoinmunes entre ellas el SSP.

#### **3.4.1 Stats e inflamación.**

La expresión aberrante de la familia de citocinas LIF/IL-6 ha sido asociada a enfermedades autoinmunes, choque séptico y neoplasia (68). Como se mencionó previamente, la activación constitutiva de Stat3 se ha observado frecuentemente en inflamación crónica. Incluso se ha descrito activación constitutiva de Stat3 entre pacientes con artritis reumatoide (AR) y pacientes con enfermedad inflamatoria

intestinal (EII). Estos mismos resultados han sido reproducidos en modelos murinos de AR y EII crónica. Otros Stats también han sido estudiados en enfermedades autoinmunes, así el incremento en la activación de Stat1 ha sido reportado en células epiteliales de pacientes con asma (69). Los ratones transgénicos de Stat4 también desarrollan colitis (70) y la vía de IL-12/Stat4 lleva a una respuesta Th1, la cual también se ha demostrado en pacientes con enfermedad de Crohn (71). Por lo tanto, los Stats juegan un rol positivo en el proceso de inflamación.

#### ***3.4.2 Regulación negativa de la vía Jak/Stat mediante la familia SOCS.***

La duración de las señales transmitidas por citocinas mediante la vía de Jak/Stat, es regulada en parte por la familia de proteínas Jak inhibitoras endógenas, a las que se les conoce como supresoras de la señalización de citocinas, del inglés: suppressors of cytokine signaling (SOCS) o citocinas-inducibles SH2, del inglés: cytokine-inducible SH2 proteins (CIS) (Figura 7) (72). La familia SOCS está compuesta por ocho proteínas relacionadas, que tienen en común un dominio SH2 seguido de un motivo llamado “caja de SOCS”, del inglés “SOCs box” (73, 74). De éstas, SOCS1 y SOCS3 juegan un papel importante en inhibir señales que participan en la vía Jak/Stat, misma que mediante la activación por citocinas conduce a inflamación. El mecanismo de acción de SOCS1 y SOCS3 es inhibir la actividad de las Jaks, SOCS1 directamente se une al sitio de activación de las Jaks a través del dominio SH2. Por otro lado, el SOCS3 se une a los receptores de citocinas (Figura 8). Tanto el SOCS1 como el SOCS3 contienen una cinasa con capacidad inhibitoria en la región amino terminal, misma que es esencial para la inhibición de Jak (75, 76).

En las siguientes figuras se muestra a la familia de las proteínas SOCS, su estructura y que es lo que las induce (figura 7); así como el mecanismo por el cual las proteínas SOCS regulan negativamente la señalización de citocinas, lo cual puede ser inhibiendo la activación de las Jaks, inhibir la fosforilación del receptor de la interleucina, para evitar el reclutamiento de los Stats o evitar que el Stat migre hacia el núcleo (Figura 8). Ambas figuras han sido adaptadas de la revisión por Hanada y Yoshimura (15).

Figura 7. Familia de las proteínas SOCS.









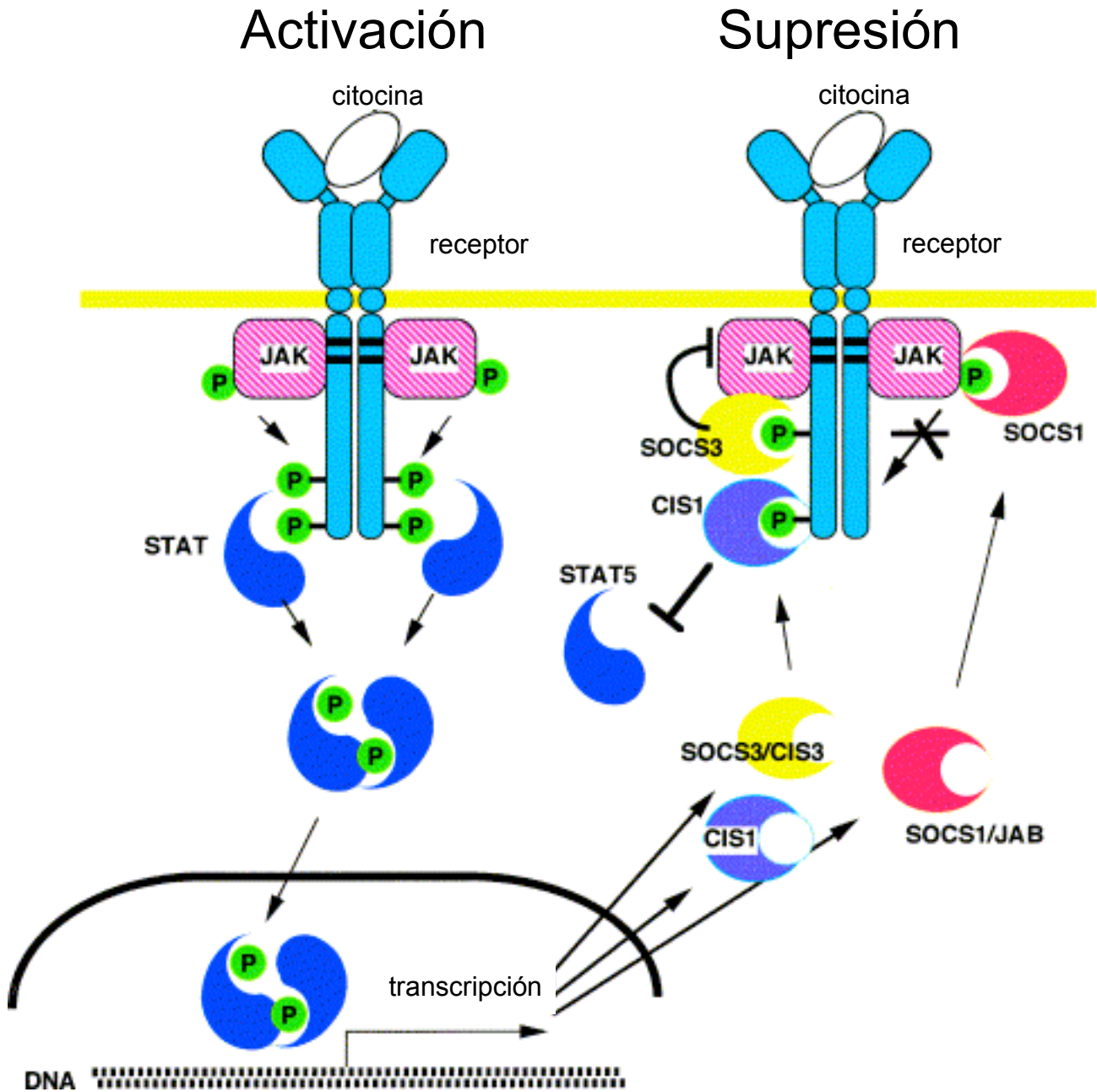
Nombre	Estructura	Inducción mediante:
CIS1		Epo, IL-2, IL-3, HC, prolactina
JAB/SSI1/SOCS1		IL-2, IFN-gamma
CIS2/SSI2/SOCS2		HC, IL-6, LIF, IGF
CIS3/SSI3/SOCS3		IL-1,-2,-3,-4,-6,-10, -11, HC, prolactina EPO, LIF, IFN-gamma, Leptina, LPS, TNF, etc.
CIS4/SOCS6		se desconoce
CIS5/NAP4/SOCS7		se desconoce
CIS6/SOCS5		IL-6, IL-12
CIS7/SOCS4		se desconoce aunque se expresa en células hematopoiéticas

Figura 8. Mecanismo por el cual las proteínas SOCS regulan negativamente la señalización de citocinas.



### **3.4.3 SOCS3 e inflamación.**

En un modelo murino deficiente en SOCS3 se observó que los ratones mueren durante el período embrionario, ya sea por alteraciones en el feto durante la eritropoiesis en el hígado o por defectos en la función de la placenta (77, 78). Sin embargo, el rol fisiológico de SOCS3 en tejido adulto se desconoce. Varios trabajos han reportado que el SOCS3 es inducido por varias citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias tales como: IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10. Se sabe que el SOCS3 regula negativamente la acción de dichas citocinas, así como las funciones de las Stats (79). La expresión elevada de SOCS3 se ha descrito en células epiteliales y de lámina propia del colon en el modelo murino de la enfermedad inflamatoria intestinal (80). En pacientes con artritis reumatoide, también se han observado altos niveles en la expresión de SOCS3 (81). Así mismo, en modelos murinos de sinovitis inflamatoria, el Stat3 fosforilado precede a la expresión de SOCS3, lo cual es consistente con la idea de que el SOCS3 es parte de la retroalimentación negativa en la vía de Jak/Stat. También se ha demostrado que el SOCS3 puede ser fosforilado y probablemente ubiquitinado en respuesta a estimulación por citocinas (82).

Con base en lo descrito, es claro que las citocinas juegan un papel crucial en la patogenia de las enfermedades autoinmunes, y entender las vías de señalización que éstas utilizan así como la regulación de las mismas es imprescindible para poder generar nuevas alternativas terapéuticas.

#### **4. HIPÓTESIS NULA**

La expresión y/o activación de Stat3 es similar en linfocitos de sangre periférica de pacientes con Síndrome de Sjögren primario (SSP) comparado con controles sanos.

#### **HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

La expresión y/o activación de Stat3 se encuentra aumentada en linfocitos de sangre periférica de pacientes con SSP comparado con controles sanos.



## **5. OBJETIVO GENERAL**

- Definir la expresión y activación de Stat3 en linfocitos T y B de sangre periférica de pacientes con SSP e individuos sanos.

### **5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Mediante la técnica de citometría de flujo, estudiar el estado de expresión y activación de Stat3 tanto en condiciones basales como posterior a la activación con IL-10, en linfocitos T y B de sangre periférica de pacientes con SSP y controles sanos.
- Analizar las vías de activación de Stat3 (i.e. Jak1 y Tyk2) en linfocitos T y B de sangre periférica de pacientes con SSP y controles sanos.
- Determinar la expresión y activación de Stat3 en glándula salival de pacientes con SSP y controles sanos.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este proyecto se sometió a consideración del comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado por parte de los pacientes, para la obtención de 60 ml de sangre periférica, explicando el objetivo y la metodología del estudio.

### Sujetos de estudio

Se estudiaron 12 pacientes femeninas con diagnóstico de SSP de acuerdo a los Criterios Europeos del 2002 (4). Ninguna de las pacientes presentó evidencia clínica de linfoma primario o de infección por el virus de la hepatitis B o C. La edad promedio fue de  $50 \pm 15$  años (rango de 21-73 años) y la duración media de la enfermedad fue  $7 \pm 6$  años (rango 1-30 años). Un factor de exclusión fue que las pacientes estuviesen en tratamiento esteroideo o inmunosupresor. Las características clínicas y demográficas de las pacientes al momento del estudio se muestran en la tabla 2. Como controles se incluyeron 12 mujeres aparentemente sanas, pareadas por edad con los pacientes.

### Materiales y métodos

**6.1 Separación de células mononucleares (CMN) de sangre periférica y estimulación *in vitro*.** A partir de 60 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA se aislaron CMN mediante gradiente de densidad Ficoll-Hystopaque (Sigma Chemical Co, St. Louis MO). Después de lavar a las células con solución

amortiguadora de fosfatos (PBS), las muestras fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) sin suplementar. En algunos experimentos las células fueron incubadas toda la noche en medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina, penicilina/estreptomicina, y suero bovino fetal al 1% (SBF) (Gibco-BRL).

Las células fueron lavadas con PBS y se ajustaron a  $5 \times 10^6$  células en 0.5ml de RPMI sin suplementar. Se llevó a cabo una cinética de activación con IL-10hr (50ng/ml PharMingen, San Diego, CA) a diferentes tiempos. Se utilizó PBS para las células no estimuladas (NS). Las células fueron incubadas a 37°C y la activación se interrumpió agregando PBS frío.

**6.2 Análisis citofluorométrico intracelular de las proteínas Jak/Stat en linfocitos T y B.** Un millón de CMN/ml fueron lavadas en PBS conteniendo 2% de SBF. Se realizó tinción de superficie con el uso de anticuerpo monoclonal anti-CD3 o anti-CD19 marcado con citocromo 5 (Cy5) (PharMingen). Después de dos lavados las células se fijaron en 1.5 mL de formaldehído al 3% en PBS durante una hora a 4°C. Las muestras se lavaron dos veces con PBS-SBF 2% para ser incubadas 30 minutos a 4°C con 2 mL de buffer de permeabilización (saponina 0.1%, HEPES 0.01M en solución de Hank pH 7.4). Para la tinción intracelular las CMN (teñidas con anti-CD3 o anti-CD19) fueron incubadas 15 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos policlonales: anti-Jak1 fosforilado (p-Jak1), anti- pTyk2 (Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA) y anti-pStat1 (hechos en cabra) o anti-pStat3 (hecho en conejo) (Cell Signaling Technology, USA). Después de lavar 2 veces con solución de permeabilización, las CMN se incubaron 15 minutos a 4°C con los anticuerpos secundarios específicos para cada especie, marcados con isoticianato

de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). En todos los experimentos se incluyó un control de fluorescencia inespecífica que solamente contenía el anticuerpo secundario. Antes del análisis, las muestras se lavaron 3 veces más. Se realizaron ventanas electrónicas para la población de linfocitos de acuerdo con sus características de tamaño y granularidad (FSC/SSC en escala lineal). La excitación de los fluorocromos se llevó a cabo a 488 nm y la emisión se detectó a 525 y 670 nm (FITC y PE-Cy5 respectivamente). Se realizó una segunda ventana para las células CD3<sup>+</sup> o CD19<sup>+</sup> para el análisis de las proteínas intracelulares en dichas subpoblaciones de linfocitos.

**6.3 Ensayo para la IL-10.** Se cultivo un millón de CMN durante 24 horas en 1 ml de medio RPMI 1640 más SBF al 10%. La concentración de la IL-10 se determinó en los sobrenadantes mediante un kit de ELISA (R&D SYSTEMS Minneapolis, MN USA) de acuerdo a protocolo estándar.

**6.4 Análisis por inmunohistoquímica.** Se obtuvieron biopsias de glándula salival de seis pacientes. Como controles estudiamos cinco biopsias de glándula salival de 5 individuos en los que se sospechó SSP, mismo que fue descartado por histología. Se utilizaron como anticuerpos primarios anti-CD3 y anti-CD20 (from Dako, Glostrup, Denmark) monoclonales y el anti-pStat3 (Cell Signaling Technology) anti-conejo policlonal. Los tejidos embebidos en parafina fueron cortados (5µm) y deshidratados con alcohol previo a su uso inmediato. Las tinciones se hicieron de acuerdo a protocolos estándar (Dako EnVision™ and cell signaling Technology). Los anticuerpos secundarios fueron anti-conejo o anti-ratón

conjugados con biotina. La diaminobenzidina (DAB) y la fosfatasa alcalina (FA) (Dako EnVision™ and cell signaling Technology) se utilizaron como cromógenos.

**Análisis Estadístico.** Los valores descriptivos de las variables se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las variables con distribución normal fueron analizadas mediante la prueba t de Student. Aquellas con distribución no normal se analizaron mediante la U de Mann-Whitney. Se consideró significativo valores de  $P < 0.05$ . El SPSS version 10.1.0 (SPSS, Chicago, IL) fue utilizado para todos los análisis.

**Tabla 2. Características clínicas de las pacientes.**

	<b>% Pacientes</b>
Aumento en tamaño de las glándulas parotídeas	70
Alteración en tiroides	31
Alteración pulmonar	15
Alteración en nervios periféricos	15
Factor reumatoide positivo	85
Anticuerpos anti-Ro/La	62

## 7. Resultados

### ***Expresión normal de Stat3 en linfocitos CD3<sup>+</sup> de pacientes con SSP.***

Aunque se desconoce cual es la clave en el proceso de autoinmunidad presente en pacientes con SSP, se sabe que existen alteraciones en linfocitos T y B (14). Para determinar el papel de Stat3 en la patógenesis del SSP analizamos mediante citometría de flujo la expresión de Stat3 en células T (CD3<sup>+</sup>) y B (CD19<sup>+</sup>) de sangre periférica de pacientes con SSP y en individuos sanos. La citometría de flujo provee ciertas ventajas: *i)* permite analizar diferentes poblaciones celulares en CMN totales, sin correr el riesgo de activación de la célula en el proceso de purificación, *ii)* requiere un mínimo de células para el análisis facilitando el estudio sobre todo en aquellos pacientes que se encuentran linfopénicos, *iii)* provee un análisis más cuantitativo en la expresión de la proteína y la activación de cada célula (83). No se observó ninguna diferencia en la expresión de Stat3 en CD3<sup>+</sup> en pacientes comparado con los individuos sanos (MFI=92±45 vs MFI=76±33, p=0.294) [figura 1A]. Cuando se analizó la expresión de Stat3 en linfocitos CD19<sup>+</sup> tampoco se observaron diferencias en la expresión de Stat3, pacientes (MFI=50±25) e individuos sanos (MFI=60±26) [figura 1B].

***Stat3 se encuentra constitutivamente fosforilado en linfocitos CD3<sup>+</sup> de pacientes con SSP.***

Durante su activación, Stat3 es fosforilado en residuos de tirosina, lo que genera que migre hacia el núcleo, donde se une al DNA y activa la transcripción de genes específicos. Con el objetivo de analizar el patrón de activación de Stat3 en células T y B de los pacientes con SSP y compararlo con individuos sanos, analizamos la presencia de pStat3 en células CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> en CMN no estimuladas. Interesantemente, encontramos que los pacientes con SSP tienen una activación constitutiva de Stat3 en células CD3<sup>+</sup> en condiciones basales (MFI=44±13), los datos son estadísticamente significativos al compararlos con los obtenidos de los individuos sanos (MFI=23±3, p=0.002) [Figura 2A]. Al analizar pStat3 en células CD19<sup>+</sup>, no encontramos una diferencia significativa entre los pacientes y los individuos sanos (MFI=156±128 vs MFI=114±80 respectivamente, p=0.309) [Figura 2B].

***La expresión de pJak1 y pTyk2 en linfocitos CD3<sup>+</sup> no estimulados de pacientes con SSP es similar a la expresión en individuos sanos.***

Después de la unión de una citocina específica (v.g.r. IL-6 o IL-10) a su receptor, las cinasas Jaks asociadas al receptor son activadas, en este caso IL-10 activa a Jak1 y Tyk2. Posteriormente, Stat3 es reclutado y activado mediante fosforilación en tirosina. Con la finalidad de estudiar si las moléculas cascada arriba, encargadas de activar Stat3 tenían un patrón de activación anormal, analizamos la fosforilación de Jak1 y Tyk2 en células T CD3<sup>+</sup> de pacientes con SSP e individuos sanos. En contraste con la activación constitutiva de Stat3 observada en los



pacientes con SSP, la activación de Jak1 no reveló ninguna diferencia entre las muestras de pacientes con SSP y de individuos sanos (MFI=50±45 vs MFI=57±40 respectivamente,  $p=0.69$ ) [Figura 3A]. De igual manera, no observamos ningún cambio con respecto a la activación de Tyk2 en los pacientes vs individuos sanos (MFI=39±27 vs MFI=39±21 respectivamente,  $p=0.99$ ) [Figura 3B].

#### ***Producción de IL-10 por CMN no estimuladas.***

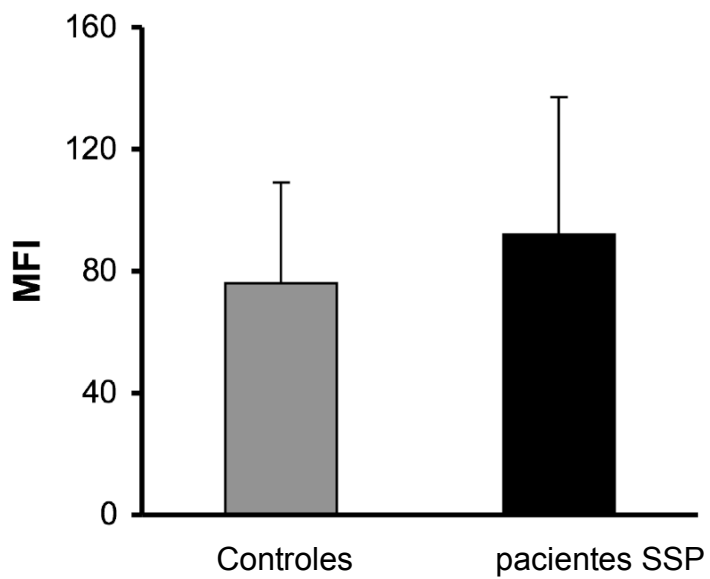
Consistente con reportes anteriores, una producción elevada de IL-10 ocurre en CMN no estimuladas de pacientes con SSP (4351±2084 pg/mL) cuando se compara con individuos sanos (344±246 pg/mL)( $p=0.005$ ) [Figura 4].

#### ***Detección de pStat3 en biopsias de glándulas salivales.***

En seis biopsias de glándulas salivales provenientes de pacientes con SSP y en cinco de individuos aparentemente sanos, se analizó la activación de Stat3 (pStat3) por inmunohistoquímica. Esta reveló importantes diferencias entre pacientes y controles. Inicialmente la tinción con hematoxilina y eosina mostró una clara destrucción de la glándula salival de los pacientes cuando se compara con la de los controles. En las glándulas de los pacientes, específicamente en las células epiteliales y en los linfocitos inflamatorios se observó activación de Stat3 (pStat3), hallazgo no observado en las biopsias de los individuos sanos [Figura 5].

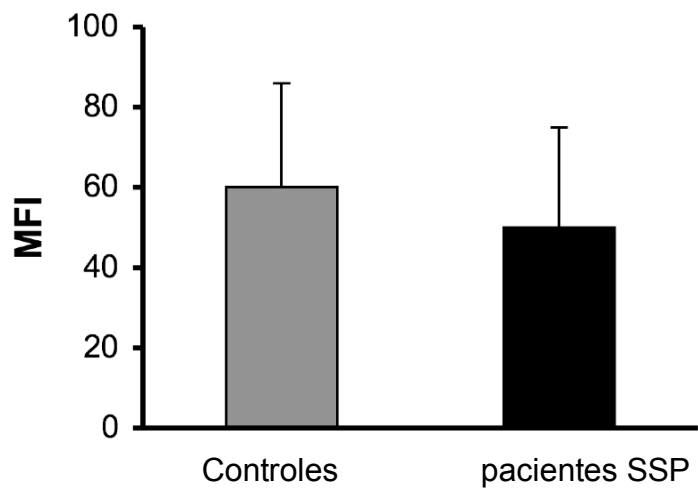
**Figura 1.** Detección intracelular de Stat3 mediante citometría de flujo en células CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>. Células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con SSP, fueron teñidas con anticuerpos de superficie anti-CD3 (A) o anti-CD19 (B), posteriormente fueron fijadas en paraformaldehído, y tinción intracelular se llevo a cabo para la detección de Stat3.

**Figura 1A.**



Y axis = índice de fluorescencia media

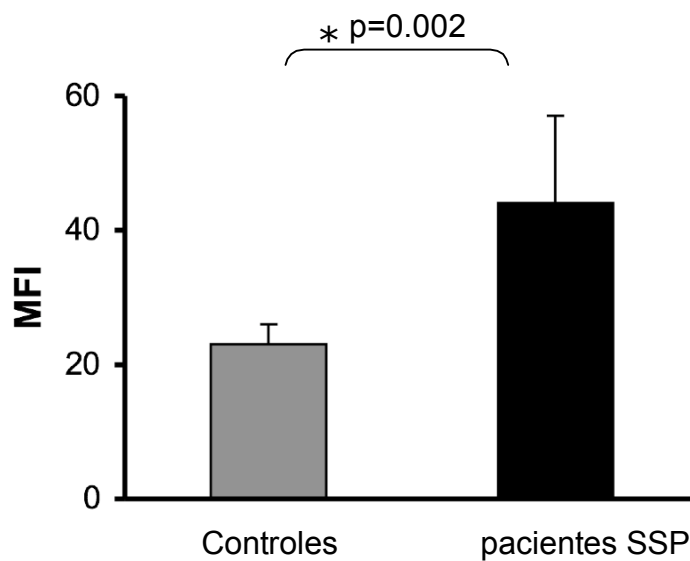
**Figure 1B.**



Y axis = índice de fluorescencia media

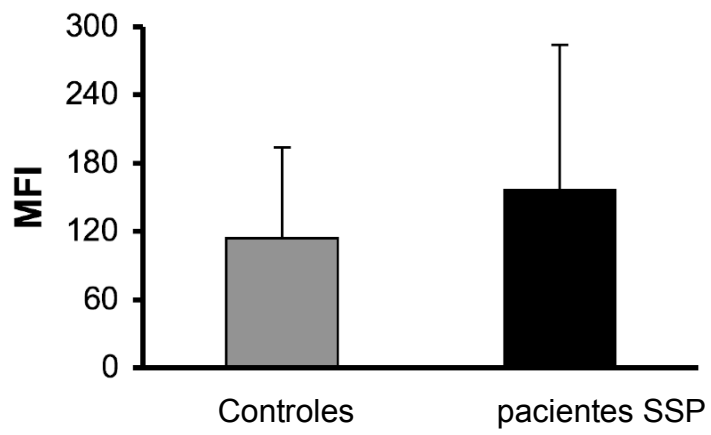
**Figura 2.** Detección intracelular de Stat3 activado (pStat3) mediante citometría de flujo en células CD3<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>. Células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con SSP, fueron teñidas con anticuerpos de superficie anti-CD3 (A) o anti-CD19 (B), posteriormente fueron fijadas en paraformaldehído, y tinción intracelular se llevo a cabo para la detección de pStat3. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

Figura 2A.



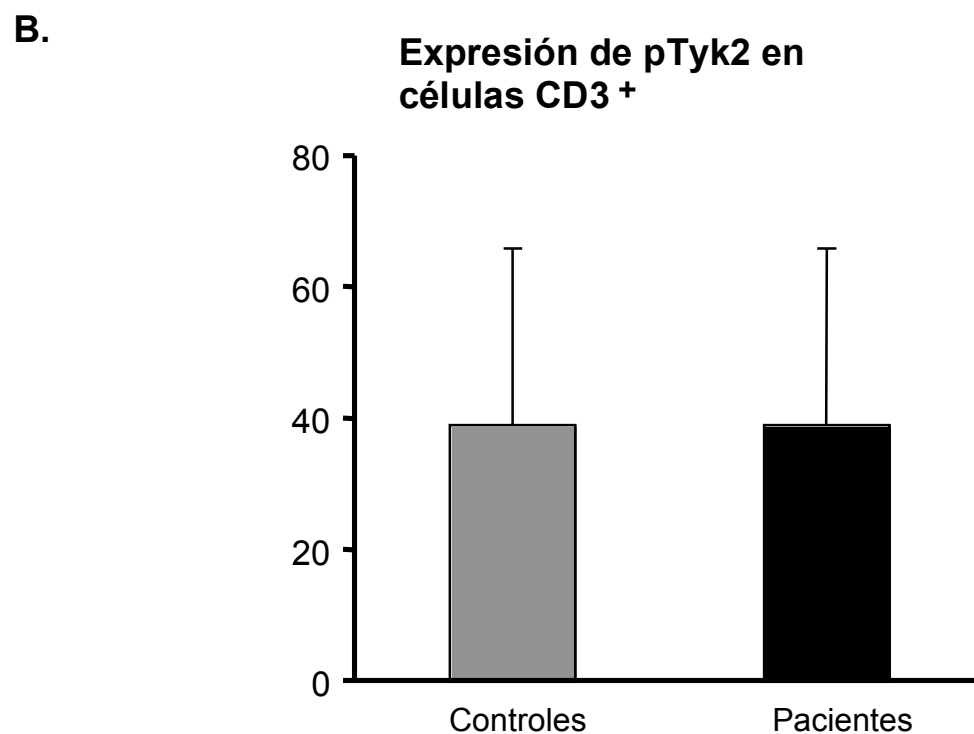
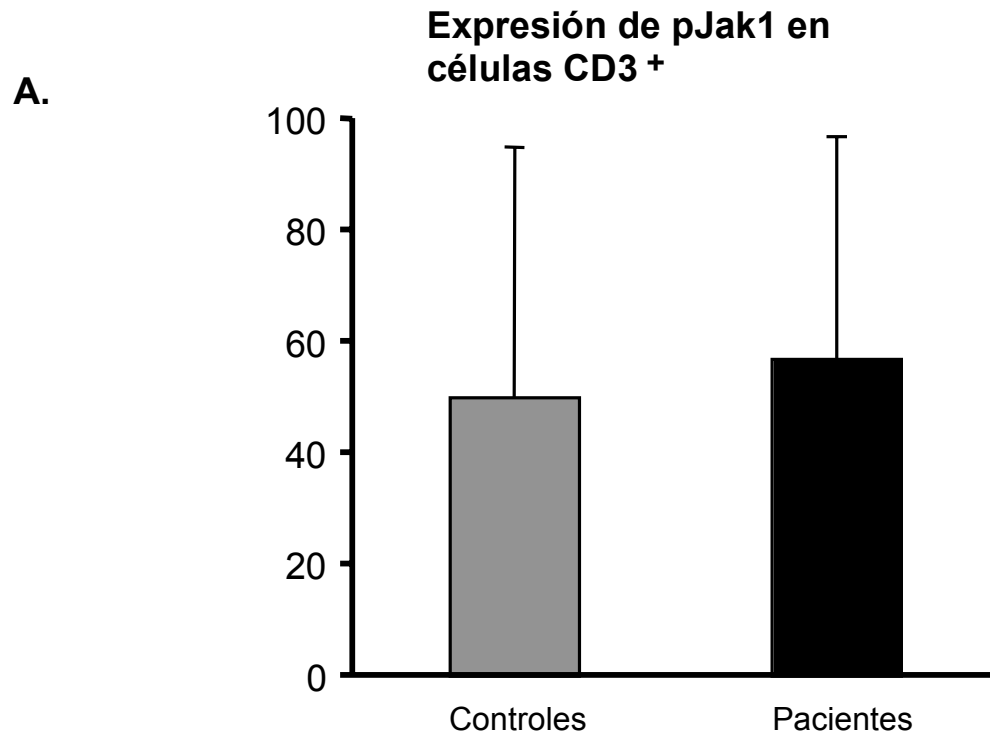
Y axis = índice de fluorescencia media

**Figura 2B.**

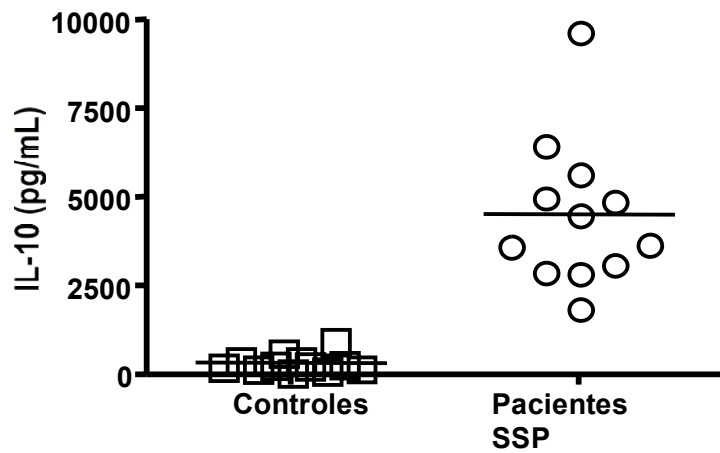


Y axis = índice de fluorescencia media

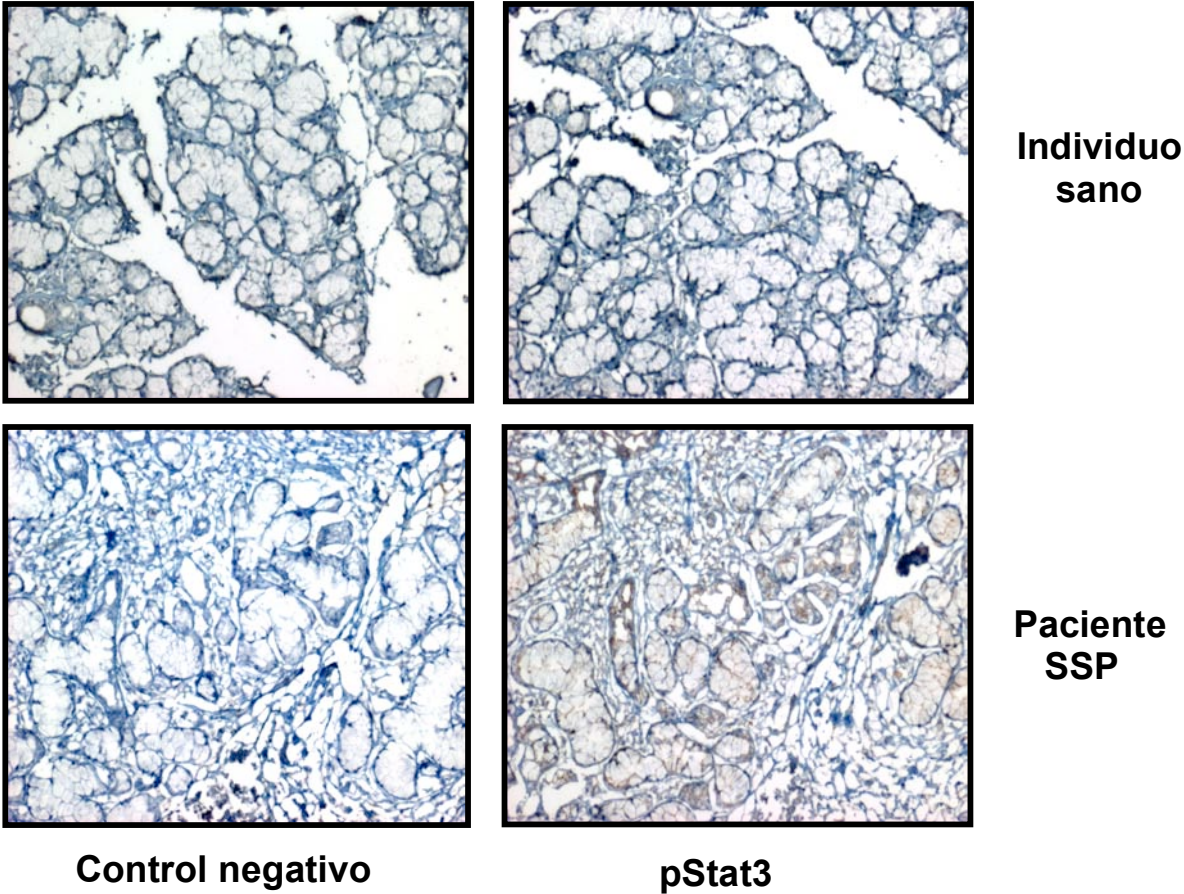
**Figura 3.** Detección de Jak1 y Tyk2 activados (pJak1 y pTyk2) mediante citometría de flujo en células CD3<sup>+</sup>. Células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con SSP, fueron teñidas con anticuerpos de superficie anti-CD3 y anti-pJak1 (A) o anti-CD3 y anti-pTyk2 (B).



**Figura 4.** La concentración de la IL-10 se determinó en los sobrenadantes de células de pacientes con SSP y controles sanos mediante un kit de ELISA.



**Figura 5.** Análisis de pStat3 por inmunohistoquímica. La detección de pStat3 se analizó en glándulas salivales de pacientes con SSP e individuos sanos.





## 7. Discusión

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por una alteración en la expresión de diversas citocinas. Por lo tanto, entender los mecanismos que llevan a tal desregulación es crítico para un mejor estudio de la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. En el SSP, la sobre-expresión de IL-10 es una alteración importante, además es consistente con varios reportes previos (84) y con datos que obtuvimos en nuestra población de estudio. Es interesante que aunque la IL-10 es regulada a nivel de transcripción y su producción esta asociada a haplotipos de IL-10 específicos (85), la asociación entre polimorfismos específicos y los niveles elevados de IL-10 son controversiales (9, 86). Ciertamente, otros elementos en *cis* y/o factores en *trans* podrían ser responsables de la sobreproducción de IL-10 observada en los pacientes con SSP. Nuestro estudio reporta la primera evidencia de que las células T CD3<sup>+</sup> de pacientes con SSP se caracterizan por una activación anormal de Stat3, factor de transcripción que es activado y que además regula la expresión de IL-10.

El Stat3 fue inicialmente descrito con actividad de unión al DNA en hepatocitos estimulados con IL-6, y capaz de interactuar selectivamente con un elemento “enhancer” en el promotor de genes de fase aguda, por lo que se conoce como elemento de respuesta de fase aguda (51, 52). En estudios posteriores se demostró que el Stat3 es activado por la familia de citocinas de IL-6, las cuales señalizan a través de gp130 y de sus receptores relacionados (56, 87). El Stat3 tiene diversos efectos pleiotrópicos, ya sea induciendo proliferación o detención del crecimiento. También se le han atribuido funciones pro y anti-apoptóticas en

diferentes contextos. En células T, el Stat3 a través de la señalización por IL-6, induce supervivencia mediante la inhibición de apoptosis (53). Por lo que el incremento en la activación de Stat3 observado en las células T de los pacientes con SSP, puede tener diferentes consecuencias en la patogénesis de la enfermedad: *i*) podría permitir la expansión de células T autoreactivas como resultado en la inhibición de apoptosis, y *ii*) podría contribuir a la expresión anormal de citocinas que son reguladas por Stat3. De manera interesante, algunas de las citocinas involucradas en la patogénesis del SSP (v.g.r. IL-10 e IL-6) llevan a la activación de Stat3 en sus células blanco. Sin embargo, es importante notar que no se observó una activación constitutiva de las proteínas-Jaks (Jak1 y Tyk2) que preceden a la activación final de Stat3 en los pacientes con SSP. Estos datos sugieren que la activación constitutiva de Stat3 observada en los pacientes con SSP podría no depender de la estimulación de citocinas y más bien ser el resultado de una inactivación inadecuada de pStat3.

La activación constitutiva de Stat3 no es una característica exclusiva de los pacientes con SSP. Se ha descrito también una activación constitutiva de Stat3 en células T residentes del intestino de pacientes con enfermedad de Crohn (88), así como en el tejido sinovial de pacientes con AR (89-91), y sin olvidar que también se ha asociado a tumorigénesis (65). En las biopsias de glándulas salivales de los pacientes con SSP, encontramos la presencia de pStat3 en células epiteliales e infiltrados linfocitarios. La presencia de pStat3 podría ser atribuida a linfocitos T, dado que es la mayor población de células que se ha observado en dichos infiltrados (92). Sin embargo, es necesario precisar cuáles son las células que expresan pStat3 y, más importante aún, seguir la evolución de los pacientes ante

un posible desarrollo de linfoma no-Hodgkin, que es un tumor con baja incidencia observado en los pacientes con SSP (5). Aún cuando en el presente trabajo no se encontró diferencias significativas en relación a la activación de Stat3 en células B, se sabe que la activación constitutiva de Stat3 juega un papel importante en linfomas de células B. Dicho efecto, es mediante el incremento en la proliferación y sobrevivencia de las células B (93).

Lo que también queda por definir es por un lado, ver si la activación constitutiva de Stat3 observada en los pacientes con SSP juega un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad o si solamente es un marcador de inflamación y, por otro estudiar si existe un defecto en los mecanismos que regulan la activación/inactivación de los Stats tales como fosfatasas o mediante la familia SOCS (discutido previamente), ya que estos mecanismos podrían estar regulados de manera inadecuada no solamente en el SSP sino también en otras enfermedades autoinmunes. Esto, seguramente, permitiría diseñar nuevas estrategias terapéuticas en dichas patologías.

## 8. Bibliografía

1. Gourley M, Miller FW. Mechanisms of disease: Environmental factors in the pathogenesis of rheumatic disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 Mar;3(3):172-80.
2. Fox RI. Sjogren's syndrome. *Lancet*. 2005 Jul 23-29;366(9482):321-31.
3. Fox RI, Tornwall J, Michelson P. Current issues in the diagnosis and treatment of Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 1999 Sep;11(5):364-71.
4. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002 Jun;61(6):554-8.
5. Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, Brito MP, Rosas J, Calvo-Alen J, et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)*. 2002 Jul;81(4):281-92.
6. James JA, Harley JB, Scofield RH. Role of viruses in systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2001 Sep;13(5):370-6.
7. Ramos-Casals M, Loustaud-Ratti V, De Vita S, Zehner M, Bosch JA, Toussiot E, et al. Sjogren syndrome associated with hepatitis C virus: a multicenter analysis of 137 cases. *Medicine (Baltimore)*. 2005 Mar;84(2):81-9.
8. Rischmueller M, Lester S, Chen Z, Champion G, Van Den Berg R, Beer R, et al. HLA class II phenotype controls diversification of the autoantibody response in primary Sjogren's syndrome (pSS). *Clin Exp Immunol*. 1998 Feb;111(2):365-71.
9. Font J, Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Aldea AI, Cervera R, Ingelmo M, et al. The role of interleukin-10 promoter polymorphisms in the clinical expression of primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 Sep;41(9):1025-30.
10. Adamson TC, Fox, R. I., Frisman, D. M., Howell, F. V. Immunohistologic analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjogren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1983 Jan;130(1):203-8.
11. Skopouli FN, Fox PC, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffe ES, Moutsopoulos HM. T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*. 1991 Feb;18(2):210-4.
12. Salomonsson S, Wahren-Herlenius M. Local production of Ro/SSA and La/SSB autoantibodies in the target organ coincides with high levels of circulating antibodies in sera of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2003;32(2):79-82.
13. Fox RI, Tornwall J, Maruyama T, Stern M. Evolving concepts of diagnosis, pathogenesis, and therapy of Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 1998 Sep;10(5):446-56.
14. Hansen A, Lipsky PE, Dorner T. Immunopathogenesis of primary Sjogren's syndrome: implications for disease management and therapy. *Curr Opin Rheumatol*. 2005 Sep;17(5):558-65.
15. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Aug-Oct;13(4-5):413-21.
16. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
17. Glimcher LH. Lineage commitment in lymphocytes: controlling the immune response. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(7):s25-s30.

18. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* 2002 Jan;71(1):1-8.
19. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1951-7.
20. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32.
21. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM, et al. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum.* 1994 Nov;37(11):1647-55.
22. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J Immunol.* 1994 Jun 1;152(11):5532-9.
23. Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M, Jonsson R. Circulating cytokines in primary Sjogren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol.* 2004 Jun;59(6):592-9.
24. Eriksson P, Andersson C, Ekerfelt C, Ernerudh J, Skogh T. Relationship between serum levels of IL-18 and IgG1 in patients with primary Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis and healthy controls. *Clin Exp Immunol.* 2004 Sep;137(3):617-20.
25. Bombardieri M, Barone F, Pittoni V, Alessandri C, Conigliaro P, Blades MC, et al. Increased circulating levels and salivary gland expression of interleukin-18 in patients with Sjogren's syndrome: relationship with autoantibody production and lymphoid organization of the periductal inflammatory infiltrate. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(5):R447-56.
26. Bertorello R, Cordone MP, Contini P, Rossi P, Indiveri F, Puppo F, et al. Increased levels of interleukin-10 in saliva of Sjogren's syndrome patients. Correlation with disease activity. *Clin Exp Med.* 2004 Dec;4(3):148-51.
27. Kok MR, Yamano S, Lodde BM, Wang J, Couwenhoven RI, Yakar S, et al. Local adeno-associated virus-mediated interleukin 10 gene transfer has disease-modifying effects in a murine model of Sjogren's syndrome. *Hum Gene Ther.* 2003 Nov 20;14(17):1605-18.
28. Zhu Z, Stevenson D, Schechter JE, Mircheff AK, Ritter T, Labree L, et al. Prophylactic effect of IL-10 gene transfer on induced autoimmune dacryoadenitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 May;45(5):1375-81.
29. Bave U, Nordmark G, Lovgren T, Ronnelid J, Cajander S, Eloranta ML, et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum.* 2005 Apr;52(4):1185-95.
30. Hayashi Y, Haneji N, Hamano H. Cytokine gene expression and autoantibody production in Sjogren's syndrome of MRL/lpr mice. *Autoimmunity.* 1996;23(4):269-77.
31. Yanagi K, Haneji N, Hamano H, Takahashi M, Higashiyama H, Hayashi Y. In vivo role of IL-10 and IL-12 during development of Sjogren's syndrome in MRL/lpr mice. *Cell Immunol.* 1996 Mar 15;168(2):243-50.
32. Horiuchi M, Yamano S, Inoue H, Ishii J, Nagata Y, Adachi H, et al. Possible involvement of IL-12 expression by Epstein-Barr virus in Sjogren syndrome. *J Clin Pathol.* 1999 Nov;52(11):833-7.
33. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.

34. Finbloom DS, Winestock KD. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1079-90.
35. Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *Embo J.* 1997 Oct 1;16(19):5894-903.
36. Lai CF, Ripperger J, Morella KK, Jurlander J, Hawley TS, Carson WE, et al. Receptors for interleukin (IL)-10 and IL-6-type cytokines use similar signaling mechanisms for inducing transcription through IL-6 response elements. *J Biol Chem.* 1996 Jun 14;271(24):13968-75.
37. Weber-Nordt RM, Riley JK, Greenlund AC, Moore KW, Darnell JE, Schreiber RD. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27954-61.
38. Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt RM. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett.* 1996 Oct 7;394(3):365-70.
39. Saito I. Structure of IL-10 and its role in autoimmune exocrinopathy. *Crit Rev Immunol.* 2000;20(2):153-65.
40. Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.* 1992 Aug;6(8):1457-65.
41. Delporte C, O'Connell BC, He X, Lancaster HE, O'Connell AC, Agre P, et al. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3268-73.
42. Ogawa N, Ping L, Zhenjun L, Takada Y, Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002 Oct;46(10):2730-41.
43. Ogawa N, Kawanami T, Shimoyama K, Ping L, Sugai S. Expression of interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11) in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Clin Immunol.* 2004 Sep;112(3):235-8.
44. Jones DT, Monroy D, Ji Z, Atherton SS, Pflugfelder SC. Sjogren's syndrome: cytokine and Epstein-Barr viral gene expression within the conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994 Aug;35(9):3493-504.
45. Halse A, Tengner P, Wahren-Herlenius M, Haga H, Jonsson R. Increased frequency of cells secreting interleukin-6 and interleukin-10 in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol.* 1999 May;49(5):533-8.
46. Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1133-7.
47. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:293-322.
48. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S121-31.

49. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994 Jun 3;264(5164):1415-21.
50. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997 Sep 12;277(5332):1630-5.
51. Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*. 1994 Apr 8;77(1):63-71.
52. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 1994 Apr 1;264(5155):95-8.
53. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1143-8.
54. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Apr 15;94(8):3801-4.
55. Sano S, Takahama Y, Sugawara T, Kosaka H, Itami S, Yoshikawa K, et al. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity*. 2001 Aug;15(2):261-73.
56. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998 Sep 1;334 ( Pt 2):297-314.
57. Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4652-60.
58. Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, et al. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*. 2003 Sep;19(3):425-36.
59. Lee CK, Raz R, Gimeno R, Gertner R, Wistinghausen B, Takeshita K, et al. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity*. 2002 Jul;17(1):63-72.
60. Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol*. 2001 Mar;21(5):1621-32.
61. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):39-49.
62. Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, Schreiber RD, Kiyono H, Takeda K, et al. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003 May;111(9):1297-308.
63. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, et al. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*. 1995 Jul 7;269(5220):81-3.
64. Bromberg J, Darnell JE, Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2468-73.
65. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. 2004 Feb;4(2):97-105.
66. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan;7(1):41-51.

67. Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, Dewilde S, Strobl B, Fu X, et al. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol*. 2004 Apr;5(4):401-9.
68. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*. 1990 Dec;11(12):443-9.
69. Sampath D, Castro M, Look DC, Holtzman MJ. Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. *J Clin Invest*. 1999 May;103(9):1353-61.
70. Wirtz S, Finotto S, Kanzler S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, et al. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol*. 1999 Feb 15;162(4):1884-8.
71. Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S, Monteleone I, Sebkova L, Doldo P, et al. Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):7234-9.
72. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:143-64.
73. Masuhara M, Sakamoto H, Matsumoto A, Suzuki R, Yasukawa H, Mitsui K, et al. Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Oct 20;239(2):439-46.
74. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6;95(1):114-9.
75. Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, et al. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells*. 1999 Jun;4(6):339-51.
76. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J*. 1999 Mar 1;18(5):1309-20.
77. Marine JC, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nakajima H, et al. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell*. 1999 Sep 3;98(5):617-27.
78. Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, et al. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9324-9.
79. Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, et al. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood*. 1999 Oct 15;94(8):2880-9.
80. Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, et al. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2001 Feb 19;193(4):471-81.
81. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, et al. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest*. 2001 Dec;108(12):1781-8.
82. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1169-76.



83. Perez OD, Nolan GP. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nat Biotechnol.* 2002 Feb;20(2):155-62.
84. Villarreal GM, Alcocer-Varela J, Llorente L. Differential interleukin (IL)-10 and IL-13 gene expression in vivo in salivary glands and peripheral blood mononuclear cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Immunol Lett.* 1996 Jan;49(1-2):105-9.
85. Anaya JM, Mantilla RD, Correa PA. Immunogenetics of primary Sjogren's syndrome in Colombians. *Semin Arthritis Rheum.* 2005 Apr;34(5):735-43.
86. Marka M, Bessenyei B, Zeher M, Semsei I. IL-10 promoter -1082 polymorphism is associated with elevated IL-10 levels in control subjects but does not explain elevated plasma IL-10 observed in Sjogren's syndrome in a Hungarian cohort. *Scand J Immunol.* 2005 Nov;62(5):474-80.
87. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000 May 15;19(21):2548-56.
88. Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, et al. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem.* 2003 May 9;278(19):16777-81.
89. Sengupta TK, Chen A, Zhong Z, Darnell JE, Jr., Ivashkiv LB. Activation of monocyte effector genes and STAT family transcription factors by inflammatory synovial fluid is independent of interferon gamma. *J Exp Med.* 1995 Mar 1;181(3):1015-25.
90. Krause A, Scaletta N, Ji JD, Ivashkiv LB. Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol.* 2002 Dec 1;169(11):6610-6.
91. Sawa S, Kamimura D, Jin GH, Morikawa H, Kamon H, Nishihara M, et al. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. *J Exp Med.* 2006 Jun 12;203(6):1459-70.
92. Fox RI, Howell FV, Bone RC, Michelson P. Primary Sjogren syndrome: clinical and immunopathologic features. *Semin Arthritis Rheum.* 1984 Nov;14(2):77-105.
93. Ding BB, Yu JJ, Yu RY, Mendez LM, Shaknovich R, Zhang Y, et al. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1515-23.

# Constitutive STAT3 activation in peripheral CD3<sup>+</sup> cells from patients with primary Sjögren's syndrome

HL Ramos<sup>1</sup>, G Valencia-Pacheco<sup>2</sup>, J Alcocer-Varela<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Rheumatology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Mexico City, and

<sup>2</sup>Department of Immunology, School of Medicine, Autonomous University of San Luis Potosí, Mexico

**Objective:** Signal transducers and activators of transcription (STATs) are crucial mediators of cytokine signalling. Constitutive activation of STATs, especially STAT3, has been reported in several diseases. Primary Sjögren's syndrome (pSS) is associated with overproduction of cytokines such as interleukin-10 (IL-10), although the mechanism by which this occurs is unknown. As STAT3 is a potent inducer of IL-10, this study focused on determining the pattern of STAT3 activation in peripheral lymphocytes from patients with pSS.

**Methods:** Twelve pSS patients and 12 healthy age-matched control subjects were studied. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by gradient centrifugation. Phosphorylated STAT3 (pSTAT3) and also STAT3 expression were determined by flow cytometry in gated CD3<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> lymphocytes. Similarly, pJak1 and pTyk2 were also determined in gated CD3<sup>+</sup> lymphocytes.

**Results:** Although the protein expression of STAT3 was similar among controls and pSS patients, we found that STAT3 was constitutively activated in CD3<sup>+</sup> lymphocytes from pSS patients. Neither Jak1 nor Tyk2 (the upstream activators of STAT3) was activated in pSS CD3<sup>+</sup> lymphocytes, suggesting that the constitutive activation of STAT3 observed in pSS patients might not depend on cytokine stimulation but instead might be the result of an abnormal inactivation of pSTAT3.

**Conclusions:** These data provide evidence of abnormal STAT3 signalling in T cells from pSS patients.

Primary Sjögren's syndrome (pSS) is a systemic autoimmune disease characterized by loss of function of lacrimal and salivary glands, resulting in dry eyes (keratoconjunctivitis sicca) and dry mouth (xerostomia). The disease has a prevalence of about 0.5% of the population and affects mainly females (female to male ratio 9:1) (1). The aetiology remains unknown, but evidence suggests the interaction of genetic and environmental factors (2). The immunological abnormalities observed in pSS patients involve an autoimmune infiltration and focal accumulation of lymphocytes in the exocrine glands, with a predominance of CD4<sup>+</sup> T cells (3). In addition, systemic abnormalities are characterized by oligoclonal B-cell

activation that leads to hypergammaglobulinaemia, immune complexes and production of autoantibodies (4). Several cytokines have been proposed to play a role in the pathogenesis of the disease (5, 6); however, among them, overproduction of interleukin-10 (IL-10) is one of the most common traits described in this disorder (5, 7).

IL-10 is a multifunctional cytokine with diverse effects on most haematopoietic cell types. It regulates B-cell activation and differentiation and induces immunoglobulin synthesis and autoantibody production. T-cell function is also affected by IL-10, inhibiting cytokine production and proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells, and in contrast has stimulatory effects on CD8<sup>+</sup> T cells (8). In pSS patients, IL-10 is released by T cells from salivary glands and by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (5, 7). Moreover, IL-10 messenger RNA (mRNA) expression is elevated in the salivary glands of pSS patients (9) and in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MpJ mice (10). In a transgenic murine model IL-10 has been reported to induce glandular tissue destruction and lymphocyte infiltration (11). The mechanisms involved in the prominent and sustained production of IL-10 in pSS are still unknown.

Haydeé L. Ramos, present address: Molecular Immunology and Inflammation Branch, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, NIH Bethesda, MD 20892-1820, USA

E-mail: ramossh@mail.nih.gov

Jorge Alcocer-Varela, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico

E-mail: jalcocer@quetzal.innsz.mx

Accepted 29 June 2007

Signal transducers and activators of transcription (STATs) proteins were identified in the past decade in the context of normal interferon signalling (12). STATs are activated by Janus tyrosine kinases (Jaks). Their activation results in the expression of genes that control important cellular functions, including cell proliferation, differentiation, development and survival, as well as other mechanisms associated with immune responses (13, 14). STAT3 overexpression has been associated with the pathogenesis of many diseases, including rheumatoid arthritis (15–17) and Crohn's disease (18). In addition, STAT3 binds to a single motif in the IL-10 promoter and elevates IL-10 gene expression (19).

In this study we demonstrate that pSS patients have constitutive activation of STAT3 in PBMCs and specifically in T cells. These results focus attention on the role of this transcription factor in the pathogenesis of pSS and the abnormal cytokine profile observed in pSS.

## Material and methods

### Patients and controls

Twelve female patients fulfilling the American–European Consensus Group criteria for the diagnosis of pSS (20) were enrolled. The study was approved by our institutional ethical committee and all subjects gave written informed consent. None of the patients had received immunosuppressive or corticosteroid therapy for at least 1 year before enrollment. Patients with a history or clinical evidence of primary lymphoma, infection with hepatitis B, C or HIV were excluded. The age of the patients ranged from 20 to 73 years (mean  $50.3 \pm 15$  years) and disease duration ranged from 1 to 30 years (mean  $7.3 \pm 7.8$  years). Twelve healthy volunteers matched by sex, race and age were included as controls.

### Detection of STAT3 expression and pSTAT3 in T and B lymphocytes by flow cytometry

Surface staining of T and B lymphocytes was performed in freshly isolated PBMCs according to standard protocols using Cy5-conjugated anti-CD3 or Cy5-conjugated anti-CD19 monoclonal antibodies (PharMingen, San Diego, CA, USA). Cells were fixed in 1% paraformaldehyde (PFA), washed and permeabilized in Hank's balanced salt solution containing 0.1% saponin and 0.01 M HEPES. Polyclonal antibodies to anti-STAT3 or anti-pSTAT3 (Cell Signaling Technology, USA) were used to detect intracellular expression of STAT3 and pSTAT3 (pTyr705); species-specific secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled polyclonal antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) was used. A control sample containing only

the secondary FITC-labelled antibody (Jackson ImmunoResearch) was included to set the threshold of the fluorescence level. Samples were analysed on a FACScan flow cytometer using the Cell Quest Software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). The mean fluorescence index (MFI) was defined as the geometric mean fluorescence channel of cells expressing any given intracellular protein/geometric mean fluorescence channel of the isotype control.

### Detection of pJak1 and pTyk2 expression in T lymphocytes by flow cytometry

Intracellular detection of pJak1 and pTyk2 was performed as described above, using goat polyclonal antibodies anti-phosphorylated Jak1 and anti-pTyk2 (SantaCruz, Biotechnology Inc., CA, USA).

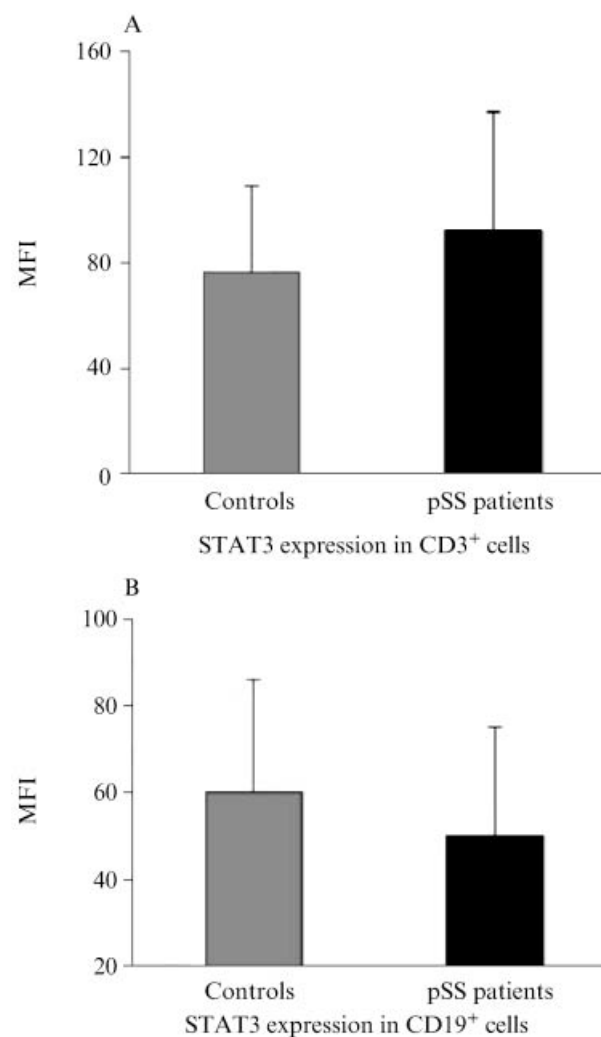


Figure 1. STAT3 expression in (A) CD3<sup>+</sup> cells and (B) CD19<sup>+</sup> cells by flow cytometry. PBMCs from healthy controls and pSS patients were fixed in PFA, stained for STAT3, and mean fluorescence intensity (MFI) determined by flow cytometry analysis. Unpaired and unequal t-tests were used for statistical analysis.

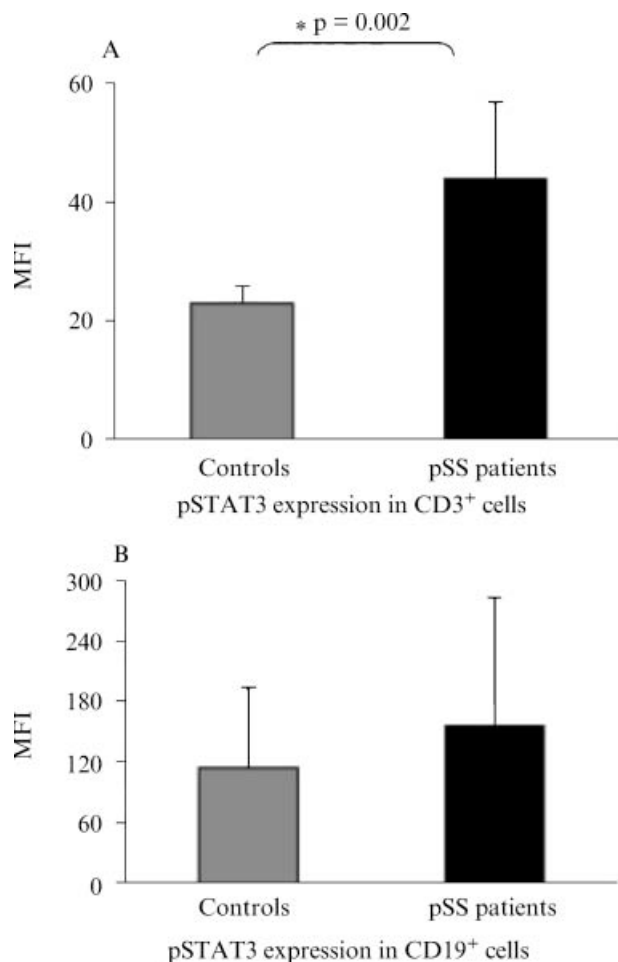


Figure 2. Phosphorylated STAT3 (pSTAT3) expression in (A) CD3<sup>+</sup> cells and (B) CD19<sup>+</sup> cells by flow cytometry. PBMCs from healthy controls and pSS patients were fixed in PFA, stained for pSTAT3, and mean fluorescence intensity (MFI) determined by flow cytometry analysis. Unpaired and unequal t-tests were used for statistical analysis.

## Results

### Normal expression of STAT3 in non-stimulated CD3<sup>+</sup> lymphocytes from pSS patients

Although the processes that underlie autoimmunity in pSS are not known, disturbances on T and B lymphocytes are probably involved (21). To determine the potential role of STAT3 in the pathogenesis of pSS, we analysed the expression of STAT3 in T and B lymphocytes from freshly isolated PBMCs obtained from pSS patients and controls. We performed these analyses by flow cytometry because (i) it allows the study of specific cell subtypes in whole PBMCs, decreasing the risk of *in vitro* cell activation as a result of extensive purification of lymphocyte subpopulations, (ii) it requires a minimal cell number for analysis, facilitating the study of lymphopaenic patients, and (iii) it allows a better quantitative analysis of protein expression and activation for each individual cell (22). When

STAT3 expression was analysed in gated CD3<sup>+</sup> cells, we observed no difference in STAT3 expression compared to controls (MFI=92±45 vs. 76±33, p=0.294) (Figure 1A). In addition, when STAT3 was analysed in CD19<sup>+</sup> gated lymphocytes, we observed no differences in the expression of STAT3 among pSS patients (MFI=50±25) and controls (MFI=60±26) (Figure 1B).

### STAT3 is constitutively phosphorylated in non-stimulated CD3<sup>+</sup> lymphocytes from pSS patients

Upon activation, STAT3 is phosphorylated at tyrosine 705 and translocates to the nucleus, where it binds DNA and activates the transcription of specific target genes. To address the status of STAT3 activation in T and B cells from pSS patients and controls directly, we analysed the presence of pSTAT3 in gated CD3<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> cells from non-stimulated freshly isolated PBMCs by using a specific polyclonal antibody that recognizes pSTAT3 (Tyr705) by flow cytometry. Surprisingly, pSS patients showed prominent phosphorylation of STAT3 in T cells (MFI=44±13), which was statistically significant compared to the controls (MFI=23±3, p=0.002) (Figure 2A). In the analysis of STAT3 phosphorylation in B cells, pSS patients showed no difference compared to controls (MFI=156±128 vs. 114±80, p=0.309) (Figure 2B).

### Jak1 phosphorylation and pTyk2 expression in non-stimulated CD3<sup>+</sup> lymphocytes are similar in pSS patients and controls

Following binding of a specific cytokine (e.g. IL-6 and IL-10) to its cognate receptor, receptor-associated Jak1 and Tyk2 are activated. STAT3 is then recruited and activated by tyrosine phosphorylation. To investigate whether upstream activators of STAT3 were also constitutively activated in pSS, we determined the status of activation of Jak1 and Tyk2 in non-stimulated CD3<sup>+</sup> lymphocytes from pSS patients and healthy controls. In contrast to the prominent STAT3 activation that characterized pSS patients, neither Jak1 nor Tyk2 were differentially activated in pSS compared to controls (Figure 3). Thus, phosphorylation of Jak1 was similar in controls compared to pSS patients (MFI=50±45 vs. 57±40, p=0.69) (Figure 3A). Similarly, pTyk2 was not different among controls and pSS patients (MFI=39±27 vs. 39±21, p=0.99) (Figure 3B).

## Discussion

Autoimmune diseases are characterized by abnormal profiles in cytokine expression. Understanding the mechanisms that underlie this process is therefore

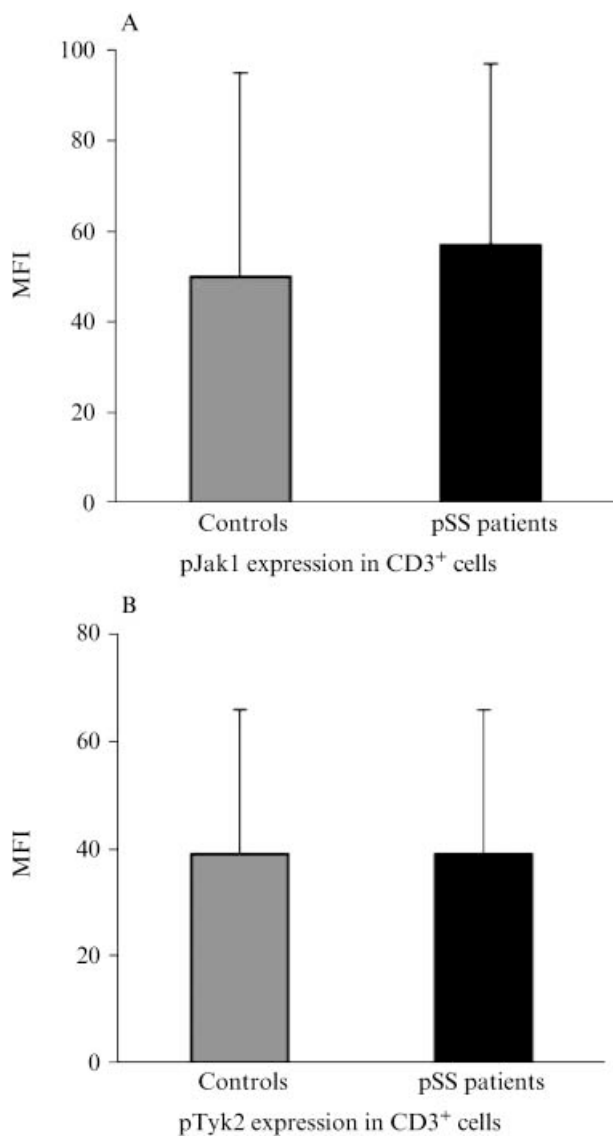


Figure 3. (A) Phosphorylated Jak1 (pJak1) and (B) pTyk2 expression in CD3<sup>+</sup> cells by flow cytometry. PBMCs from healthy controls and pSS patients were fixed in PFA, stained for pJak1 (or pTyk2), and mean fluorescence intensity (MFI) determined by flow cytometry analysis. Unpaired and unequal t-tests were used for statistical analysis.

crucial in the study of autoimmune disease pathogenesis. In pSS, the overexpression of IL-10 is among the most important and consistent findings observed (5). Although IL-10 is regulated at the level of transcription and IL-10 production is related to specific IL-10 haplotypes (23), the association between specific polymorphisms and the elevated IL-10 levels in pSS is controversial (24, 25). It is therefore likely that other cis-elements and/or trans-factors are responsible for the IL-10 overproduction observed in pSS. The study reported here provides the first evidence that peripheral T cells in pSS are characterized by an abnormal activation of STAT3, a transcription factor that regulates the expression of IL-10.

STAT3 was first described as a molecule with DNA-binding activity, found in IL-6-stimulated hepatocytes, that was capable of selectively interacting with an enhancer element in the promoter of acute-phase genes, known as the acute-phase response element (26, 27). Further studies demonstrated that STAT3 is activated by the entire family of IL-6-type cytokines, which signal through gp130 and related receptors (28, 29). STAT3 has pleiotropic effects on cells, inducing either proliferation or growth arrest. It also has pro- and anti-apoptotic effects in different contexts. In T cells, STAT3 induces survival through IL-6-mediated suppression of apoptosis (30). The increased activation of STAT3 observed in T cells from pSS patients might therefore have different consequences in the pathogenesis of the disease: (i) it might allow the expansion of autoreactive T cells as a result of decreased apoptosis, and (ii) it might contribute to the abnormal cytokine expression of genes that are regulated by this transcription factor. Although some cytokines involved in the pathogenesis of pSS (e.g. IL-6 and IL-10) induce STAT3 activation in their target cells, it is noteworthy that the activation pattern of Jak1 and Tyk2 did not correlate with the pSTAT3 levels in pSS patients. These data might suggest that the constitutive activation of STAT3 observed in pSS patients might not depend on cytokine stimulation, but instead might be the result of an abnormal inactivation of pSTAT3.

The persistent activation of STAT3 is not a unique characteristic of pSS. Constitutive phosphorylation of STAT3 has been described in intestinal T cells from patients with Crohn's disease (18) as well as in rheumatoid arthritis synovial tissue (15–17). Whether the constitutive activation of STAT3 might be a crucial pathway in the pathogenesis of the autoimmune disease or whether it is only an additional marker of inflammation is yet to be determined. In preliminary studies carried out at our laboratory (unpublished observations), we found no alterations in the expression and/or activation of other STATs (i.e. STAT1) in pSS, suggesting that indeed an abnormal activation through STAT3 might be crucial in the pathogenesis of pSS. The data presented here highlight the importance of dissecting the activation and negative regulatory pathways (e.g. SOCS, PIAS, tyrosine phosphatases) that might be altered in human autoimmune diseases, particularly SOCS3, a negative regulator of activated STAT3 (31). Modulation of these pathways might be a useful approach for designing new strategies for immunotherapy in autoimmune diseases.

#### Acknowledgements

We thank Dr Luis Llorente, Yvonne Richaud-Patin (National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico) and Dr Felipe Andrade (Johns Hopkins

University School of Medicine, Baltimore, MD, USA) for their support throughout this work, and critical reading of this manuscript. We also thank Dr John J. O'Shea (NIAMS, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) for his invaluable help and suggestions, and Wendy T. Watford (NIAMS) and Gustavo Pacheco-Rodríguez (NHLBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) for helpful discussions. We are also grateful to all the patients and healthy volunteers who made this study possible. H. L. Ramos was supported by a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT G34753-M), Mexico. This work is part of the PhD degree thesis of H. L. Ramos, Autonomous University of México (UNAM).

## References

1. Fox RI, Tornwall J, Michelson P. Current issues in the diagnosis and treatment of Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11:364–71.
2. Fox RI, Pearson G, Vaughan JH. Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J Immunol* 1986;137:3162–8.
3. Skopouli FN, Fox PC, Galanopoulou V, Atkinson JC, Jaffe ES, Moutsopoulos HM. T cell subpopulations in the labial minor salivary gland histopathologic lesion of Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1991;18:210–14.
4. Moutsopoulos HM, Zerva LV. Anti-Ro (SSA)/La (SSB) antibodies and Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1990;9(Suppl 1):123–30.
5. Villarreal GM, Alcocer-Varela J, Llorente L. Differential interleukin (IL)-10 and IL-13 gene expression in vivo in salivary glands and peripheral blood mononuclear cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Immunol Lett* 1996;49:105–9.
6. Garcia-Carrasco M, Font J, Filella X, Cervera R, Ramos-Casals M, Siso A, et al. Circulating levels of Th1/Th2 cytokines in patients with primary Sjogren's syndrome: correlation with clinical and immunological features. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:411–15.
7. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM, et al. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1994;37:1647–55.
8. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
9. Ohshima Y, Nakamura S, Matsuzaki G, Shinohara M, Hiroki A, Fujimura T, et al. Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996;39:1376–84.
10. Jabs DA, Prendergast RA, Rorer EM, Hudson AP, Whittum-Hudson JA. Cytokines in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MpJ mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2567–71.
11. Saito I, Haruta K, Shimuta M, Inoue H, Sakurai H, Yamada K, et al. Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J Immunol* 1999;162:2488–94.
12. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415–21.
13. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293–322.
14. Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651–62.
15. Sengupta TK, Chen A, Zhong Z, Darnell JE Jr, Ivashkiv LB. Activation of monocyte effector genes and STAT family transcription factors by inflammatory synovial fluid is independent of interferon gamma. *J Exp Med* 1995;181:1015–25.
16. Krause A, Scaletta N, Ji JD, Ivashkiv LB. Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol* 2002;169:6610–16.
17. Sawa S, Kamimura D, Jin GH, Morikawa H, Kamon H, Nishihara M, et al. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. *J Exp Med* 2006;203:1459–70.
18. Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, et al. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:16777–81.
19. Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 2000;165:1612–17.
20. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554–8.
21. Hansen A, Lipsky PE, Dorner T. Immunopathogenesis of primary Sjogren's syndrome: implications for disease management and therapy. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:558–65.
22. Perez OD, Nolan GP. Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nat Biotechnol* 2002;20:155–62.
23. Anaya JM, Mantilla RD, Correa PA. Immunogenetics of primary Sjogren's syndrome in Colombians. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34:735–43.
24. Font J, Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Aldea AI, Cervera R, Ingelmo M, et al. The role of interleukin-10 promoter polymorphisms in the clinical expression of primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1025–30.
25. Marka M, Bessenyei B, Zeher M, Semsei I. IL-10 promoter –1082 polymorphism is associated with elevated IL-10 levels in control subjects but does not explain elevated plasma IL-10 observed in Sjogren's syndrome in a Hungarian cohort. *Scand J Immunol* 2005;62:474–80.
26. Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 1994;77:63–71.
27. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994;264:95–8.
28. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000;19:2548–56.
29. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334:297–314.
30. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002;109:1143–8.
31. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503–29.