



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**Papel de la Ligasa de Ubicuitina Cbl-b en el Fenómeno de Resistencia a  
Anergia en Células T de Pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

P R E S E N T A:

M.C. DIANA GÓMEZ MARTÍN

Tutor: Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela

Comité Tutoral

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dra. Ma. Teresa Tusié Luna

Dra. Ma. Jesús Ibarra Sánchez

Departamento de Inmunología y Reumatología, INCMNSZ, México, D.F.,

México

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, Facultad de Medicina,

UNAM





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDOS	PÁGINAS
Resumen	3-4
1. Marco Teórico	5-9
2. Planteamiento del Problema	10
3. Justificación	11
4. Pregunta de Investigación	12
5. Hipótesis	12
6. Objetivos	13
7. Material y Métodos	14-18
8. Resultados	19-28
9. Discusión	29-35
10. Conclusiones	36
11. Referencias Bibliográficas	37-40
12. Anexos. Tabla 1 y Figuras 1-10	41-51
<b>13. Producción científica</b>	<b>52</b>
<b>13.1 Quantitative and functional profiles of CD4+ lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. Clin Exp Immunol 2011 April; 164(1):17-25.</b>	<b>53-61</b>
<b>13.2 Follicular helper T cells poise immune responses to the development of autoimmune pathology. Autoimmun Rev 2011; April 10 (6): 325-30.</b>	<b>62-67</b>
<b>13.3 Early growth response transcription factors and the modulation of immune response: Implications towards autoimmunity. Autoimmunity Reviews 2010; 9: 454-8.</b>	<b>68-72</b>
<b>13.4 Interleukin 2 and systemic lupus erythematosus. Beyond the transcriptional regulatory net abnormalities. Autoimmunity Reviews 2009; Sep 9 (1):34-9.</b>	<b>73-78</b>

## Resumen

La ligasa de ubiquitina Cbl-b (Casitas B-lineage Lymphoma-b) forma parte del programa genético inducido por anergia. Su deficiencia en modelos murinos se ha asociado al desarrollo de patología autoinmune similar al lupus eritematoso generalizado y al fenotipo de resistencia a anergia. El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión de Cbl-b y la regulación de la señalización a través del receptor de células T (TCR) dependiente de dicha ligasasa de ubiquitina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG ante condiciones anergizantes. La expresión de Cbl-b fue evaluada mediante PCR en tiempo real y western blot en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica de pacientes con LEG (n=20, 11 pacientes en remisión y 9 activos sin tratamiento inmunosupresor) y controles sanos (n=20) ante la inducción de anergia con ionomicina. La respuesta proliferativa fue evaluada mediante CFSE. La producción de citocinas se analizó mediante luminometría en los sobrenadantes de cultivos celulares. La expresión de marcadores de activación y coestimulación fue analizada mediante citometría de flujo. Se realizaron ensayos de transfección para sobre-expresión de Cbl-b y la fosforilación de cinasas asociadas al TCR fue evaluada en las células transfectadas. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG en comparación con controles sanos mostraron una mayor respuesta proliferativa e incremento en la producción de IL-2, así como mayor expresión de marcadores de activación (CD69, CD83) y co-estimulación (CD40L) ante el protocolo anergizante. Este fenotipo de

resistencia a anergia se asoció a una expresión deficiente de la ligasa de ubiquitina Cbl-b (transcrito y proteína) en los pacientes con LEG al comparar con los controles sanos. Este defecto no depende del estado de diferenciación del linfocito T, pues se presentó tanto en células vírgenes como de memoria efectoras. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> primarios humanos tratados con ionomicina, mostraron un incremento en la fosforilación de MAPK(ERK1/2) y disminución en la fosforilación de Akt, como marcadores del estado anérgico. La sobre-expresión de Cbl-b se asoció a una regulación diferencial en las vías de señalización a través del TCR, caracterizada por incremento en p-MAPK/p-PKC $\theta$  y disminución en p-Akt/p-PI3K en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG, lo cual sugiere la reversibilidad del fenómeno de resistencia a anergia en LEG posterior a la sobre-expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b.

El análisis entre pacientes activos vs remisión no mostró diferencias para ninguna de las variables evaluadas.

Nuestros hallazgos muestran que en LEG, la alteración en los mecanismos de tolerancia periférica está parcialmente relacionada con la deficiencia de Cbl-b en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Así mismo, nuestros datos sugieren que en LEG, la ligasa de ubiquitina Cbl-b es capaz de regular vías de señalización a través del TCR, como aquellas asociadas con PKC $\theta$ , MAPK (Erk1/2), Akt y PI3K.

## **1. MARCO TEÒRICO**

### **Ubicuitinaci3n y su relaci3n con el sistema inmune**

La ubicuitinaci3n es un mecanismo de modificaci3n postraducciona, que consiste en la conjugaci3n de una prote3na de 76 amino3cidos, llamada ubicuitina a una prote3na substrato. Este proceso implica una secuencia de reacciones enzim3ticas, que involucra tres diferentes tipos de enzimas: E1 (activadora), enzima conjugadora (E2) y, finalmente una ligasa de ubicuitina (E3) la cual transfiere la ubicuitina activada a un residuo de lisina en la prote3na blanco, siendo este 3ltimo paso el que brinda la especificidad al sistema <sup>1,2</sup>. La ubicuitinaci3n puede ser dependiente e independiente de prote3lisis. Dentro de sus m3ltiples funciones se destaca la modulaci3n de la respuesta inmune, espec3ficamente de los mecanismos de tolerancia perif3rica, tales como la anergia <sup>3</sup>.

La autoinmunidad es una reacci3n que el sistema inmune monta en contra de ant3genos propios (auto ant3genos), e implica una respuesta encaminada a mantener un estado activo de vigilancia en contra de dichos auto-ant3genos, el cual puede servir como mecanismo de protecci3n.. Se conocen diversos mecanismos que limitan la activaci3n de c3lulas autoreactivas potencialmente nocivas. En t3rminos generales, se denominan mecanismos de tolerancia perif3rica e incluyen su eliminaci3n y/o la limitaci3n de su activaci3n, lo que se logra mediante diversos mecanismos, tales como la acci3n supresora de c3lulas T reguladoras y la anergia <sup>4,5</sup>.

La ubiquitinación es capaz de regular la respuesta inmune, al modular el equilibrio entre la activación y el desarrollo de tolerancia, específicamente en la anergia. En este caso, las ligasas de ubiquitina (E3) constituyen los principales elementos de regulación <sup>6,7</sup>.

### **Anergia y Ubiquitinación. Mecanismos Moleculares**

La anergia se define como un estado en el cual el linfocito T es inactivado funcionalmente de manera intrínseca, posterior a la unión del antígeno con el receptor de células T (TCR) y es incapaz de responder a la re-estimulación antigénica. Las células anérgicas muestran disminución en la proliferación celular y en la síntesis de interleucina 2 (IL-2) ante el reto antigénico. Dicho fenómeno se ha documentado *in vivo* e *in vitro* a través de la estimulación del TCR en ausencia de coestimulación (CD28); y mediante el empleo de ionóforos de calcio, como la ionomicina <sup>8</sup>. En estos modelos se ha descrito la reversión de la anergia, mediante el empleo de dosis altas de IL-2 <sup>9</sup>.

Recientemente, se ha propuesto que la alteración en los mecanismos de anergia juegan un papel etiopatogénico en diversas enfermedades autoinmunes, entre las cuales se encuentra el lupus eritematoso generalizado. Macián y cols <sup>10</sup> demostraron que el proceso de inducción de anergia se lleva a cabo cuando la activación y translocación del factor de transcripción NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) sucede en ausencia de la de AP-1. Dicho desequilibrio se asocia a la activación de un programa genético particular que determina la transcripción de proteínas que funcionan como reguladores negativos de la señalización a través del TCR, esto mediante defosforilación, proteólisis de moléculas de señalización, o bloqueo de la transcripción de

citocinas efectoras. Este programa genético cuyo resultado fenotípico es la anergia es completamente diferente al asociado a una respuesta inmune productiva <sup>10</sup>.

### **Papel de Cblb como Factor de Anergia**

Recientemente, se ha destacado el papel de las ligasas de ubiquitina (E3), tales como Cbl-b (Casitas B lymphoma), GRAIL (Gene Related to Anergy in Lymphocytes) e Itch, cuyos genes forman parte del programa inducido por la vía de calcio/calcineurina <sup>10-12</sup>. La expresión de Cbl-b induce anergia al disminuir la fosforilación de la fosfolipasa C  $\gamma$ -1 (PLC $\gamma$ -1), lo que altera las vías de señalización dependientes de calcio <sup>13</sup> y la formación de una sinapsis inmunológica efectiva <sup>14, 15</sup>. Así mismo, Cbl-b funciona como regulador negativo de la fosforilación de Vav 1, acoplado a la proliferación y la producción de IL-2 al requerimiento de coestimulación a través de CD28. La importancia de Cbl-b en la regulación de la respuesta inmune también se demuestra en los ratones deficientes en esta ligasa, ya que desarrollan autoinmunidad espontánea e inmunopatología inducida por un reto antigénico <sup>16, 17</sup>.

### **Defectos intrínsecos en LEG. Resistencia a Anergia y su relación con la Ligasa de Ubiquitina Cbl-b.**

El lupus eritematoso generalizado <sup>18</sup> es una enfermedad autoinmune crónica, considerada como el prototipo de las enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado que los pacientes con LEG tienen defectos en los mecanismos de tolerancia periférica <sup>19, 20</sup>. Sin embargo, éstos no se han delineado con precisión. Se conoce que las células T de los pacientes con LEG tienen un

comportamiento anormal, ya que son resistentes a la supresión por células reguladoras<sup>21</sup>; además no tienen la capacidad de volverse anérgicas en presencia de auto-antígenos<sup>22</sup>

Las células T de los pacientes con LEG tienen diversos defectos en los mecanismos de activación celular. Se ha encontrado, que presentan un estado parcial de activación, pero no se activan en forma óptima si son estimuladas *in vitro*<sup>23</sup>. Algunos de estos defectos semejan a aquellos considerados específicos de células anérgicas<sup>20</sup>. Por ejemplo, se encuentra alterada la expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR/CD3, así como la producción de IL-2; un incremento en la fosforilación de cinasas de tirosina y en la producción de inositol1,4,5-trifosfato. Lo anterior, conlleva a una mayor liberación de calcio intracelular y al predominio de vías de señalización que se asocian a la expresión y translocación nuclear de NF-AT<sup>19, 24, 25</sup>.

Aunado a lo anterior, en modelos murinos de LEG, se ha demostrado que las células T CD4<sup>+</sup> son resistentes a la inducción de anergia<sup>26</sup> y que sobre expresan de manera persistente CD40L, aún ante un protocolo anergizante. Esto se ha relacionado con un defecto en la fosforilación de Cbl-b y la expresión continua de ERK (extracelular signal-regulated kinase) fosforilada<sup>27</sup>. Recientemente, Doníz-Padilla L, et al. reportaron que pacientes mexicanos con LEG presentan una discreta disminución en la expresión de Cbl-b en sangre periférica en asociación al polimorfismo 2126(A/G) del gen de *Cbl-b*<sup>28</sup>. Sin embargo, cabe destacar que la expresión de Cbl-b fue evaluada en condiciones basales y en células mononucleares totales.

En resumen, las ligasas de ubiquitina como Cbl-b que forman parte del programa genético inducido por anergia, son de gran relevancia para la

regulación de la respuesta inmune tanto en condiciones fisiológicas como en patologías autoinmunes. La resistencia a anergia que muestran los linfocitos CD4<sup>+</sup> de ratones deficientes en Cbl-b con un fenotipo similar a LEG, les confiere un mecanismo de evasión mediante el cual los linfocitos autoreactivos son capaces de activarse en condiciones inadecuadas, como la ausencia de coestimulación, y en consecuencia asociarse con la inducción y mantenimiento de enfermedades autoinmunes.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El LEG es una enfermedad autoinmune caracterizada por alteraciones en los procesos de activación y anergia de células T. Se desconoce cuales son los defectos que subyacen a dichas alteraciones funcionales. Específicamente, se desconoce si existen alteraciones en la expresión de Cbl-b y la modulación de la señalización a través del receptor de células T (TCR) mediada por dicha ligasa de ubiquitina en células T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG ante la inducción de un protocolo anergizante.

Debido a la asociación entre defectos en la expresión de ligasas de ubiquitina y la adquisición de un fenotipo de resistencia a anergia en células T, se propone que las alteraciones en la regulación de la señalización a través del TCR mediada por Cbl-b puede tener un papel fisiopatogénico en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, tales como el lupus eritematoso generalizado.

### 3. JUSTIFICACIÓN

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

Por otra parte, también es importante resaltar que recientemente se ha demostrado que la incidencia en población catalogada como “hispana” es mayor a la reportada para otros grupos étnicos, llegando a ser de aproximadamente 94 casos por 100 000 individuos <sup>29</sup>, mientras que en Estados Unidos se han reportado entre 14.6 y 50.8 casos por 100 000 individuos <sup>30</sup>.

Desde el punto de vista fisiopatogénico, la resistencia que muestra una célula T a la anergia le confiere un mecanismo de evasión mediante el cual es capaz de activarse en condiciones inadecuadas, lo que se asocia con la inducción y mantenimiento de autoinmunidad en enfermedades tales como el LEG. El defecto en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b se asocia a un fenotipo de resistencia a anergia en modelos murinos con patología similar al LEG. El análisis de la expresión de Cbl-b y el conocimiento de los mecanismos de regulación de la señalización del TCR mediada por dicha ligasa de ubiquitina es de gran relevancia para ampliar el modelo fisiopatogénico de la enfermedad.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son las alteraciones en la expresión de Cbl-b y la regulación de la señalización a través del TCR mediada por esta ligasa que confieren un fenotipo de resistencia a anergia a las células T de pacientes con LEG?

#### **5. HIPÓTESIS**

Existe disminución en la expresión de Cbl-b y alteraciones en la regulación de la señalización del TCR mediada por esta ligasa de ubiquitina en células T de pacientes con LEG en comparación con sujetos normales, lo que le confiere un fenotipo de resistencia a anergia a las células T de pacientes con LEG.

## **6. OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar la expresión de Cbl-b y la regulación de la señalización del TCR mediada por esta ligasa de ubiquitina, así como la respuesta efectora y proliferativa en células T de pacientes con LEG en diferentes estados funcionales.

### **Específicos**

1. Evaluar la respuesta (proliferación, producción de citocinas y marcadores de activación) de células T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG al protocolo de anergia mediante el tratamiento con ionomicina.

2. Determinar los efectos de la sobre-expresión de Cbl-b en el fenotipo de células T normales y de pacientes con LEG, en términos de proliferación celular y función efectora (producción de citocinas).

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

*Pacientes y Controles.* Se estudiaron pacientes con diagnóstico de LEG acorde a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología<sup>31</sup> provenientes del servicio de consulta externa de reumatología y hospitalización del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se obtuvo la información clínica relevante a partir de su expediente. Se registró la actividad de su enfermedad el día de la toma de la muestra de acuerdo al índice SLEDAI<sup>32</sup>.

### Criterios de Inclusión

#### **Pacientes:**

- Pacientes de 18 a 45 años de edad con diagnóstico de LEG según los criterios del Colegio Americano de Reumatología, en remisión (SLEDAI=0) ó activos (SLEDAI  $\geq$ 5).
- Sin antecedentes de tratamiento con corticoesteroides e inmunosupresores en los 12 meses previos a la toma de muestra para pacientes en remisión y 1 mes previo para pacientes activos.
- Aceptación voluntaria de ingreso al estudio (consentimiento informado).

#### **Controles:**

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

## Criterios de Exclusión

- Diagnóstico de intolerancia a carbohidratos o Diabetes Mellitus <sup>33</sup>.
- Diagnóstico de neoplasia al momento de la toma de muestra o en los 5 años previos.
- Diagnóstico de embarazo o puerperio.

El protocolo fue aprobado por el comité de ética Institucional. La participación de los pacientes y controles fue voluntaria; cada individuo firmó una hoja de consentimiento informado.

**Obtención de células.** Los experimentos se realizaron con células T CD4<sup>+</sup> obtenidas de sangre periférica. A cada sujeto se le extrajeron 60-100 mL de sangre venosa periférica que fue anticoagulada con heparina. Se separaron las células mononucleares, por centrifugación a través de gradientes de densidad (Ficoll-Hypaque). Las células CD4<sup>+</sup> se obtuvieron por medio de microesferas magnéticas por selección negativa, con una pureza mayor a 98%.

**Expresión de Cbl-b.** Se obtuvieron células T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y controles. Se trabajaron los siguientes estados funcionales: a)Reposo: Medio de cultivo RPMI; b)Activación: Primer estímulo con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 (2.5 µg/ml) soluble por 18 horas, posteriormente las células fueron lavadas y se dejaron en reposo con RPMI suplementado por 48 horas y posteriormente se les aplicó el segundo estímulo con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 (2.5 µg/ml) soluble por 96 horas, posterior a lo cual, las células fueron cosechadas para evaluar la respuesta proliferativa y efectora; c) Anergia: Primer estímulo con ionomicina 1µM por 18 horas, posteriormente las células fueron lavadas y se dejaron en reposo con RPMI

suplementado por 48 horas y posteriormente se les aplicó el segundo estímulo con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 (2.5 µg/ml) soluble por 96 horas, posterior a lo cual, las células fueron cosechadas para evaluar la respuesta proliferativa y efectora. Las muestras para expresión de Cbl-b se obtuvieron posterior al primer estímulo.

a) Expresión de RNAm: Se obtuvo RNA total de las células T en los diferentes estados funcionales previamente descritos, posterior al primer estímulo. Se empleó la técnica de purificación RNeasy (QIAGEN) y posteriormente se sintetizó DNAc por RT-PCR mediante el empleo de polimerasa AMVRT. Se amplificaron por medio de PCR en tiempo real usando primers específicos para cbl-b: **Reverse 5'CCCTTATTTCAAGCCCTGATT3'**; **Forward 5' TCCTCCCATCAGGATAAAGAT 3'**.

b) Expresión de proteína: Se obtuvieron lisados de las células T en los diferentes estados funcionales previamente descritos, posterior al primer estímulo y se evaluó la expresión de la proteína Cbl-b mediante western blot. Brevemente, las células fueron lisadas con buffer de lisis ELB y posteriormente se realizó electroforesis en geles SDS-PAGE al 9% y transferencia a membranas de nitrocelulosa. Se empleó el anticuerpo primario específico para Cbl-b (IgG, ratón, Santa Cruz) y anticuerpo secundario anti-ratón. Se reveló mediante quimioluminiscencia con ECL. Se obtuvieron las autoradiografías y se analizaron mediante densitometría y se normalizó con beta-actina.

**Cuantificación de proliferación.** Previo a la aplicación del protocolo de reactivación, las células T fueron incubadas con éster de diacetato succinimidil carboxifluoresceína (CFSE). Después del estímulo, se cuantificó la fluorescencia de las células en un citómetro de flujo. La proliferación se

calculó de acuerdo al índice de proliferación celular <sup>34</sup>.

**Cuantificación de citocinas y moléculas de activación.** Se midió la producción de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por luminometría en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se cuantificó (con anticuerpos específicos y citometría de flujo) la expresión de CD69, CD83 y CD40L como marcadores de activación celular y coestimulación.

**Sobre-expresión de Cbl-b.** Se transfectaron células T CD4<sup>+</sup> de pacientes y controles con un plásmido que contiene el cDNA silvestre de Cbl-b (pCEFL) mediante el método de lipofectamina y se determinaron los efectos sobre las vías de señalización a través del TCR (p-PKC, p-Akt, p-PI3K, pMAPK) mediante western blot.

**Estados Funcionales post-transfección.** Las células CD4<sup>+</sup> transfectadas se estudiaron en diferentes estados: A) Post inducción de anergia: Se empleó anergia inducida por ionomicina <sup>35</sup>. Las células T CD4<sup>+</sup> fueron estimuladas con ionomicina (1  $\mu$ M, 400 ng/ml) durante 18 horas. Se mantuvieron en cultivo con RPMI 1640 adicionado con 10% de suero bovino fetal hasta completar 48 horas post-transfección. Posteriormente las células fueron cosechadas, lavadas y re-estimuladas durante diferentes tiempos (5', 10', 15') con anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) y anti-CD28 (2.5  $\mu$ g/ml) solubles. Se utilizó como control aquellas células que no fueron pretratadas con ionomicina, pero que a las 48 horas post-transfección fueron re-estimuladas durante 5', 10', 15' con anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) y anti-CD28 (2.5  $\mu$ g/ml) solubles.

**Expresión de cinasas asociadas al TCR.** Se obtuvieron células T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y controles. Se transfectaron y después de 48 horas y bajo las condiciones experimentales mencionadas previamente, se

obtuvieron las células T para su análisis por western blot. Brevemente, las células fueron lisadas con buffer de lisis ELB y posteriormente se realizó electroforesis en geles SDS-PAGE al 9-11% y transferencia a membranas de nitrocelulosa. Se emplearon los anticuerpos primarios específicos: p-Akt, p-PKC $\theta$ , p-PI3K, p-MAPK (ERK1/2), Akt, PKC $\theta$ , PI3K, MAPK (ERK1/2) y anticuerpos secundarios anti-conejo. Se reveló mediante quimioluminiscencia con ECL. Se obtuvieron las autoradiografías y se analizaron mediante densitometría con normalización con proteínas totales.

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

### **Consideraciones Éticas**

La participación de los pacientes y controles fue voluntaria; cada individuo firmó una hoja de consentimiento informado (Anexo 1)

Los investigadores se apegaron a los preceptos de la Declaración de Helsinki. Así mismo, seguimos los lineamientos éticos en materia de investigación que señala la Norma Oficial Mexicana (NOM 166-SSA1-1997).

## 8. RESULTADOS

### 1. Evaluación de la respuesta proliferativa en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG

Se incluyeron a 20 pacientes con diagnóstico de LEG (11 en remisión y 9 activos), y 20 controles sanos, ajustados por edad y género, cuyas características demográficas y clínicas se describen en la Tabla 1.

Se obtuvieron CMN de sangre periférica y se purificaron linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La respuesta proliferativa fue evaluada mediante citometría de flujo por el método de dilución de CFSE. Las células fueron cosechadas después del segundo estímulo.

Posterior a la inducción de activación, se observó una menor respuesta proliferativa en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con LEG en comparación con controles ( $100.4 \pm 36.2$  vs  $577.5 \pm 102$ ,  $p= 0.001$ ). Ante el protocolo anergizante con ionomicina, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con LEG mostraron mayor proliferación vs controles ( $293.9 \pm 117.3$  vs  $16.7 \pm 6.3$ ,  $p=0.031$ ). La respuesta proliferativa en las diferentes condiciones experimentales se muestran en la **Figura 1**. No se encontraron diferencias para los índices de proliferación entre pacientes activos en comparación con aquellos en remisión.

En resumen, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con LEG presentan una respuesta aberrante ante el protocolo anergizante con ionomicina, lo cual corresponde al fenómeno de resistencia a anergia, previamente descrito en modelos murinos de LEG.

## 2. Análisis de la respuesta efectora en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG

### 2.1 Producción de citocinas ante diferentes condiciones experimentales

La inducción de anergia se caracteriza tanto por disminución en la proliferación, como en la síntesis de IL-2, por lo que evaluamos la producción de esta citocina y otras, en los sobrenadantes de cultivos celulares posterior a la re-estimulación antigénica.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG mostraron disminución en la producción de IL-2 posterior al protocolo de activación *in vitro* en comparación con los controles sanos. Por su parte, posterior al tratamiento con ionomicina, se documentó incremento en los niveles de IL-2 en los cultivos celulares de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG al compararse con los controles ( $99 \pm 38.6$  pg/ml vs  $11.9 \pm 4.8$  pg/ml,  $p= 0.040$ ) (**Figura 2**). Este incremento aberrante en la producción de IL-2 forma parte del denominado fenómeno de resistencia a anergia.

Debido a que existe controversia en cuanto a la producción de otras citocinas ante el protocolo anergizante, se evaluaron también IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Posterior al tratamiento con ionomicina, encontramos incremento en la producción de IL-4 ( $26.1 \pm 7$  pg/ml vs  $8.8 \pm 2.9$  pg/ml,  $p= 0.036$ ) e IL-17 ( $718.9 \pm 262.1$  pg/ml vs  $96 \pm 67$  pg/ml,  $p= 0.035$ ) y disminución en IL-10 ( $165.1 \pm 68.7$  pg/ml vs  $1217.7 \pm 596.9$  pg/ml,  $p= 0.030$ ) en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG en comparación con controles, tal como se muestra en la **Figura 3**. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las otras citocinas

evaluadas. Tampoco se encontraron diferencias para ninguna citocina entre pacientes activos en comparación con aquellos en remisión.

En resumen, el fenómeno de resistencia a anergia en LEG se caracteriza no solo por el incremento aberrante en la producción de IL-2, sino por un desequilibrio tanto en citocinas pro-inflamatorias como supresoras.

## **2.2 Expresión de marcadores de activación y coestimulación ante diferentes condiciones experimentales**

La respuesta proliferativa, síntesis de citocinas y expresión de diversos marcadores de activación y coestimulación están íntimamente relacionados con la respuesta del linfocito T ante diversos estímulos.

Debido a que encontramos diferencias claras en la respuesta proliferativa y producción de citocinas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG vs controles ante el protocolo anergizante, decidimos evaluar la respuesta en términos de la expresión de marcadores de activación (CD69 y CD83) y coestimulación (CD40L) ante las diferentes condiciones experimentales. Ante el protocolo anergizante con ionomicina, encontramos incremento en el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> ( $20.1 \pm 4.7$  vs  $2.1 \pm 0.78$ ,  $p < 0.001$ ); CD4<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup> ( $30.7 \pm 4.2$ , vs  $10.1 \pm 1.1$ ,  $p = 0.001$ ) y CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> ( $33.6 \pm 3.5$  vs  $15.1 \pm 2.5$ ,  $p < 0.001$ ) en pacientes con LEG al compararse con el de los controles sanos. El porcentaje de células positivas para dichos marcadores ante las diferentes condiciones experimentales se muestra en la **Figura 4**. No se documentaron diferencias entre pacientes activos vs remisión.

Estos datos sugieren que el incremento aberrante en la expresión de marcadores de activación y coestimulación pueden ser considerados como

parte del fenotipo de resistencia a anergia en pacientes con LEG.

### **3. Expresión de Cbl-b en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG (RNAm y proteína)**

La ligasa de ubiquitina Cbl-b es considerada como un factor de anergia que funciona como molécula adaptadora entre la síntesis de IL-2, la proliferación y el requerimiento de coestimulación. Debido a que nuestros hallazgos previos demuestran que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con LEG muestran un fenotipo de resistencia a anergia, nos preguntamos si dicho fenotipo pudiera estar asociado al defecto en productos del programa genético inducido por anergia, particularmente la ligasa de ubiquitina Cbl-b.

Para evaluar lo anterior, analizamos la expresión de Cbl-b en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG en comparación con controles sanos posterior a la inducción de anergia con ionomicina. Brevemente, se obtuvieron CMN de sangre periférica y posteriormente se seleccionaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> por selección negativa mediante microesferas magnéticas. Se evaluó la expresión del transcrito de Cbl-b en las siguientes condiciones experimentales: 1) Activación: Las células T CD4<sup>+</sup> fueron estimuladas con anti-CD3 unido a placa (5 µg/ml) y anti-CD28 soluble (2.5 µg/ml) por 18 horas (primer estímulo), posteriormente se lavaron y fueron dejadas en reposo en medio de cultivo RPMI suplementado por 48 horas. Posterior al reposo, las células fueron lavadas y re-estimuladas con anti-CD3 unido a placa (5 µg/ml) y anti-CD28 soluble (2.5 µg/ml) por 96 horas (segundo estímulo); 2) Anergia: Las células T CD4<sup>+</sup> fueron estimuladas con ionomicina (1µM) por 18 horas, posterior a lo cual las células fueron dejadas en reposo en RPMI suplementado por 48 horas y

posteriormente se re-estimularon como se describió previamente; 3) Reposo: Las células fueron mantenidas bajo los tiempos previamente mencionados en medio RPMI suplementado. Para las 3 condiciones experimentales, el material para RNA total fue obtenido posterior al primer estímulo.

Posterior a la inducción de anergia con ionomicina, encontramos disminución en la expresión normalizada del transcrito de Cbl-b en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG en comparación con controles sanos ( $0.21 \pm 0.04$ , vs  $0.47 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ). Interesantemente, la expresión de Cbl-b también fue menor posterior al protocolo de activación en las muestras de pacientes con LEG, sin alcanzar significancia estadística (**Figura 5A**).

Posteriormente, evaluamos la expresión de Cbl-b a nivel de proteína bajo las condiciones experimentales descritas previamente mediante western blot. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG mostraron menor expresión de Cbl-b ante condiciones anergizantes en comparación con controles ( $0.85 \pm 0.09$ , vs  $1.75 \pm 0.39$ ,  $p < 0.001$ ). La expresión normalizada de Cbl-b (proteína) ante las diferentes condiciones experimentales en los grupos de estudio se muestra en la **Figura 5B**. Así mismo, cabe destacar que no se encontraron diferencias entre pacientes con LEG activo y aquellos en remisión, tal como se muestra en la **Figura 5C**. Tanto para la expresión del transcrito como para la de la proteína de Cbl-b no se encontraron diferencias entre pacientes activos vs aquellos en remisión.

#### **4. Expresión de Cbl-b en diferentes subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup>**

Estudios previos han demostrado que la susceptibilidad a la inducción de anergia es diferente entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes y de memoria,

siendo las células de memoria más resistentes a la inducción de anergia<sup>36, 37</sup>.

Por lo anterior, decidimos evaluar si el defecto en la expresión de Cbl-b que se asocia a la resistencia de anergia dependía de la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> evaluados.

Incluimos 6 pacientes con diagnóstico de LEG (3 en remisión y 3 con LEG activo) y 6 controles sanos ajustados por edad y género. Purificamos las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y de memoria efectoras mediante selección con microesferas magnéticas, con una pureza aproximada del 97%. Encontramos que la expresión de Cbl-b evaluada mediante western blot fue significativamente menor en pacientes con LEG en comparación con controles sanos, sin encontrar diferencias significativas entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes y de memoria (**Figura 6**).

En sangre periférica, no se documentaron diferencias en el porcentaje de células vírgenes vs memoria efectoras entre pacientes y controles. Debido a que las células vírgenes son más susceptibles a la inducción de anergia y que encontramos que los pacientes con LEG tienen menor cantidad de células vírgenes en sangre periférica en comparación con controles sanos (12.67% vs 3.97%,  $p < 0.05$ ), el fenómeno de resistencia a anergia observado podría ser secundario a un efecto predominante sobre las células de memoria efectoras. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la expresión de Cbl-b entre células vírgenes y de memoria efectoras en pacientes con LEG.

Por lo anterior, podemos concluir que el defecto en la expresión de Cbl-b posterior a la inducción de anergia es global y no depende del estado de activación del linfocito T CD4<sup>+</sup>.

Dicho defecto no depende de la actividad de la enfermedad y puede considerarse un defecto intrínseco de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG.

## **5. Cinética de las proteínas fosforiladas asociadas a la señalización a través del receptor de células T**

Decidimos evaluar la respuesta a las condiciones de activación y anergia en términos de la expresión de proteínas fosforiladas asociadas a la señalización a través del TCR, algunas de las cuales son sustratos de Cbl-b. Para lo anterior, se aislaron CMN de sangre periférica de controles sanos y posteriormente se purificaron linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Se evaluaron las siguientes condiciones experimentales: A) Activación: anti-CD3 (5 µg/ml) y anti-CD28 (2.5 µg/ml) solubles y B) Anergia: Ionomicina 1µM. Se estimularon a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a los siguientes tiempos: 2 min, 5 min, 10 min y 15 min. La expresión de p-Akt, p-MAPK y p-PKCθ no mostró diferencias significativas en ambas condiciones experimentales. Por lo anterior, se repitió el experimento, incluyendo un estímulo de anergia de por lo menos 16 horas y posteriormente se realizó la cinética ya descrita, encontrándose una disminución en la expresión de p-Akt y un aumento en la expresión de p-MAPK posterior al pre-tratamiento con ionomicina en comparación con aquellas células que no habían sido pre-tratadas con ionomicina.

El perfil de fosforilación global mostró un incremento en las proteínas fosforiladas posterior al pre-tratamiento con ionomicina, lo cual se asoció a un incremento en la expresión de Cbl-b. Dicho experimento se realizó empleando también como protocolo anergizante, la estimulación con anti-CD3 (5 µg/ml)

en ausencia de coestimulación, con lo cual obtuvimos resultados comparables a aquellos encontrados en las células tratadas con ionomicina (**Figura 7**).

## **6. Sobre-expresión de Cbl-b en linfocitos T CD4<sup>+</sup> primarios. Papel en la regulación de la señalización a través del receptor de células T.**

### *6.1 Linfocitos T CD4<sup>+</sup> primarios humanos de controles sanos.*

Estudios previos han demostrado que Cbl-b es una ligasa de ubiquitina, que forma parte del programa genético asociado a anergia y funciona como molécula adaptadora entre la proliferación, la síntesis de IL-2 y el requerimiento de coestimulación a través de CD28. El defecto en la expresión de esta ligasa de ubiquitina se asocia al fenómeno de resistencia a anergia en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG. Por lo anterior, decidimos evaluar los efectos de la sobre-expresión de esta ligasa de ubiquitina en términos de la expresión de diversas proteínas fosforiladas asociadas a la señalización del receptor de células T, que incluyen p-PKC $\theta$  y p-PI3K, que se conocen como sustrato de esta ligasa y otras como p-Akt y p-MAPK, las cuales son básicas para evaluar la regulación de la señalización del TCR.

Los experimentos se realizaron con controles sanos, de diferente género, la mayor parte de ellas mujeres, con una media de edad de 32 años. Se empleó el plásmido pCEFL que contiene el cDNA silvestre de Cbl-b marcado con HA (donado por el Dr. Stanley Lipkowitz, NIH). Las transfecciones se realizaron en linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante el método de lipofectamina, bajo las condiciones experimentales descritas en Material y Métodos. La eficiencia de transfección se evaluó mediante la determinación de HA por western blot y mediante la cotransfección con el plásmido EGFP.

Tomando en cuenta los experimentos de cotransfección, la eficiencia de transfección fue de 30-45%.

Se evaluó la expresión de p-PKC $\theta$ , p-Akt, p-PI3K y p-MAPK, documentándose disminución en la expresión de p-Akt y aumento en p-PKC $\theta$  y p-MAPK en linfocitos T CD4<sup>+</sup> primarios que sobre-expresaban Cbl-b y pre- tratados con ionomicina. **(Figura 9A, B, C)**

### *6.2 Linfocitos T CD4<sup>+</sup> primarios humanos de pacientes con LEG.*

Nuestros hallazgos demuestran un defecto en la expresión de Cbl-b en pacientes con LEG, el cual se asoció al fenómeno de resistencia a anergia, caracterizado por incremento en la proliferación y producción de IL-2 ante la re-estimulación antigénica. Este fenómeno de resistencia a anergia no ha sido evaluado a detalle en términos de las alteraciones en la regulación de la señalización a través del TCR que se asocian con dicho fenómeno.

Así mismo, tampoco se ha evaluado si dichas alteraciones pueden ser reversibles al sobre-expresar Cbl-b.

Por lo anterior realizamos los experimentos de sobre-expresión de Cbl-b en pacientes con LEG. Se incluyeron 6 pacientes con LEG (4 en remisión y 2 activos sin tratamiento inmunosupresor). Se evaluaron cinasas tales como p-PKC $\theta$ , p-Akt y p-MAPK. Estos experimentos se realizaron bajo las condiciones previamente descritas para linfocitos T CD4<sup>+</sup> de controles sanos.

Los resultados muestran que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG que sobre-expresan Cbl-b y pre-tratados con ionomicina, a los 5 y 10 minutos posteriores a la re-estimulación antigénica (anti-CD3 y anti-CD28) mostraron incremento en la expresión de p-MAPK en comparación con los linfocitos T

CD4<sup>+</sup> que no sobre-expresan Cbl-b. Sin embargo, la expresión de p-Akt fue variable tanto en pacientes como en controles sanos.

Tomando en cuenta los hallazgos previos en cuanto al incremento de p-MAPK como marcador de anergia, la sobre-expresión de Cbl-b en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG podría asociarse a la reversibilidad del fenómeno de resistencia a anergia.

## 9. DISCUSIÓN

Nuestros datos muestran que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG presentan un defecto en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b asociado al fenotipo de resistencia a anergia, mediante un protocolo anergizante con ionomicina. Así mismo, este fenotipo se asocia a un desequilibrio en la producción de citocinas pro-inflamatorias y supresoras e incremento en los marcadores de activación y co-estimulación.

Las ligasas de ubiquitina como Cbl-b han sido ampliamente reconocidas como factores de anergia<sup>6, 38, 39</sup>, las cuales están incluidas dentro del programa genético asociado a anergia y dependiente de la vía de calcio-calcineurina<sup>10, 12</sup>. Cbl-b es capaz de regular el umbral de activación del linfocito T, a través de diferentes mecanismos, tales como funcionar como una molécula adaptadora entre la señalización a través del complejo TCR/CD2 y la co-estimulación mediante moléculas B2 con la síntesis de IL-2, posterior a las señales de activación. Así mismo, se ha demostrado que esta ligasa de ubiquitina modula la respuesta del linfocito T al inducir la internalización del TCR posterior a la unión del ligando<sup>15</sup>.

A pesar de que la deficiencia de ligasas de ubiquitina, como Cbl-b se ha asociado al desarrollo de autoinmunidad espontánea y adquisición del fenotipo de resistencia a anergia en los modelos murinos<sup>13, 16</sup>. Específicamente, en LEG, se han descrito una gran variedad de alteraciones a nivel de los linfocitos T, incluyendo una respuesta deficiente ante el estímulo mitogénico in vitro, alteraciones en la señalización a través del TCR, múltiples defectos transcripcionales a nivel de IL-2 y resistencia a anergia, a pesar de mostrar simultáneamente un estado de mayor activación de diversas cinasas

asociadas al TCR, lo cual también se ha considerado como un defecto característico de células anérgicas<sup>19, 24, 40-51</sup>.

El trabajo de Yi<sup>27</sup> mostró deficiencia en la expresión de la forma fosforilada de Cbl (homólogo de Cbl-b) en lisados provenientes de líneas celulares transitorias obtenidas de pacientes con LEG, sin encontrar diferencias en la expresión de la forma no fosforilada posterior a la inducción de anergia a tiempos cortos (10 minutos). Sin embargo estas células mostraron parte del fenotipo de resistencia a anergia, caracterizado por incremento en la producción de IL-2, posterior al estímulo anergizante.

Recientemente, Doníz-Padilla L, et al. reportaron que pacientes mexicanos con LEG presentan una discreta disminución en la expresión de Cbl-b en sangre periférica en asociación al polimorfismo 2126(A/G) del gen de *Cbl-b*<sup>28</sup>. Sin embargo, cabe destacar que la expresión de Cbl-b fue evaluada en condiciones basales y en células mononucleares totales.

Nuestro trabajo es el primero que reporta la deficiencia de la ligasa de ubiquitina Cbl-b, tanto a nivel del transcrito como en proteína en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG en comparación con controles sanos, posterior a la inducción de anergia con ionomicina, lo cual a su vez se asoció al fenotipo de resistencia a anergia. Cabe destacar que existen múltiples diferencias metodológicas en comparación con el trabajo de Yi<sup>27</sup>, pues en éste, se emplearon líneas celulares transitorias, las cuales pueden tener diferencias en el umbral de activación/anergia dado que fueron estimuladas previamente con IL-2, la cual sabemos que se encuentra deficiente en sujetos con LEG. Así mismo, la evaluación de la expresión se realizó a tiempos cortos (10 min) y experimentos realizados en nuestro laboratorio muestran que la expresión a

tiempos cortos es muy errática, probablemente asociada a diversas modificaciones postraduccionales. Nuestros hallazgos complementan los previamente reportados en población mestizo-mexicana <sup>28</sup>

Nuestro trabajo es el primero en corroborar la presencia del fenómeno de resistencia a anergia en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG, pues solo se había documentado en los modelos murinos.

Estudios previos han demostrado que la susceptibilidad a la inducción de anergia es diferente entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes y de memoria, siendo las células de memoria más resistentes a la inducción de anergia<sup>36, 37</sup>. Dicha resistencia a la anergia podría estar relacionada con un defecto predominante de Cbl-b en esta subpoblación celular en LEG. Sin embargo nosotros no encontramos ni incremento en el porcentaje de células de memoria en sangre periférica de pacientes con LEG ni diferencias en la expresión de Cbl-b entre células vírgenes y de memoria efectoras. Por lo anterior, podemos concluir que en LEG, el defecto en la expresión de Cbl-b posterior a la inducción de anergia es global y no depende del estado de activación del linfocito T CD4<sup>+</sup>.

Dentro de la respuesta a estímulos mitogénicos, nuestros resultados concuerdan con lo previamente reportado en la literatura <sup>24, 40, 52</sup>, en términos de una respuesta proliferativa y síntesis de IL-2 deficiente *in vitro*.

Sin embargo posterior a la inducción de anergia, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG se caracterizan por un incremento aberrante en la síntesis de IL-2. De hecho, esta síntesis incrementada de IL-2 pudiera funcionar como mecanismo para perpetuar la resistencia a anergia, pues la señalización a través del receptor de IL-2 mediada a través de JAK3 and mTOR es capaz de inhibir la expresión de algunos de los productos del programa genético de

anergia, dentro de los cuales se incluye Cbl-b<sup>53</sup>. Los datos previamente mencionados son consistentes con el hecho de que la adición de IL-2 exógena a dosis altas es capaz de revertir la inducción de anergia<sup>9, 35</sup>.

Nuestros resultados muestran también un desequilibrio a nivel de otras citocinas, con un incremento en IL-4 e IL-17 y disminución en IL-10, posterior al tratamiento con ionomicina en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG en comparación con controles sanos. El trabajo de Villarino A,<sup>54</sup> mostró que con la inducción de un protocolo de tolerancia adaptativa, los linfocitos T de ratones DO11 mostraron disminución en la producción de IL-4 e IL-17. Estos autores demuestran que existe un incremento en la producción del RNAm para dichas citocinas, sin embargo documentan que los linfocitos T autoreactivos presentan un bloqueo a nivel traduccional, que involucra elementos ricos en AU. Nuestros resultados concuerdan con dichos hallazgos, pues los linfocitos T de pacientes con LEG que son resistentes a anergia muestran el fenotipo contrario, caracterizado por niveles elevados de IL-4 e IL-17. Este incremento puede ser efecto de modificaciones epigenéticas<sup>55</sup> como se ha demostrado para otras citocinas como IFN $\gamma$ . De hecho nuestros hallazgos concuerdan con reportes previos en los cuales los niveles elevados de IL-17 son característicos de LEG<sup>56</sup>, sin embargo nuestro trabajo es el primero en demostrar que este fenómeno ocurre no solo posterior a la activación mitogénica, si no también ante un protocolo anergizante. Por otra parte, la disminución en los niveles de IL-10 es un hallazgo novedoso, pues demuestra como en LEG, la producción de esta citocina es muy dependiente del estado de activación del linfocito T. Acorde a trabajos previos, posterior a la estimulación mitogénica, se documentó incremento en los niveles de IL-10 en comparación con los

linfocitos T de controles sanos. Sin embargo, posterior al protocolo anergizante con ionomicina, nosotros encontramos disminución de la producción de esta citocina en los linfocitos T de pacientes con LEG. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Waiczies S<sup>57</sup>, quien documentó el requerimiento de IL-10 para la inducción de anergia por atorvastatina en linfocitos T humanos específicos para PBM (proteína básica de mielina). Por lo anterior, la disminución en la producción de IL-10 pudiera funcionar como un mecanismo asociado a la resistencia a la inducción de anergia en LEG.

En cuanto a la expresión de marcadores de activación, nosotros encontramos un incremento en los marcadores de activación, tales como CD69, lo cual es opuesto a lo reportado por Zhang et al<sup>58</sup> en células T de ratones Cbl-b<sup>-/-</sup>. Sin embargo, dicha diferencia puede radicar en que el defecto de Cbl-b en los pacientes con LEG no es una deficiencia absoluta, como en el caso de los ratones transgénicos. Además actualmente su impacto funcional no ha sido elucidado. Por otra parte, nuestros resultados en cuanto a incremento persistente en la expresión de CD40L, corresponden a lo reportado por Yi et al<sup>27</sup> y pueden corresponder a uno de los mecanismos por el que las células T de los pacientes con LEG sobre-expresan CD40L como mecanismo compensador para tratar de revertir la resistencia a anergia. Recientemente se han descrito CD40L<sup>59</sup> y CD83<sup>60</sup> como sustratos de otra ligasa de ubiquitina denominada GRAIL. En nuestro estudio encontramos incremento persistente de la expresión de dichos marcadores, lo cual podría sugerir que sean sustratos compartidos entre GRAIL y Cbl-b.

Estudios previos han mostrado que la inducción de anergia clonal mediante el empleo de ionomicina o con estimulación mediante anti-CD3 en ausencia de

coestimulación a través de CD28 se asocia a disminución en la fosforilación de diversas cinasas asociadas al TCR como Akt, PI3K, PKC $\theta$  y MAPK<sup>61-63</sup>. Sin embargo, otros trabajos han mostrado que la inducción de anergia mediante ionomicina puede no asociarse a cambios en la activación de MAPK<sup>64, 65</sup>. La mayor parte de la evidencia a este respecto proviene de líneas celulares murinas y no de linfocitos T primarios humanos, lo cual puede explicar parcialmente la discrepancia con nuestros hallazgos.

Se ha reportado que niveles altos de pMAPK son capaces de promover el arresto en el ciclo celular mediante la inducción de la expresión de inhibidores CDK como p27<sup>Kip1</sup><sup>66-68</sup>. De hecho, la inducción de anergia clonal se ha asociado a su vez al arresto en el ciclo celular, específicamente aquella inducida por ionomicina y atorvastatina<sup>57</sup>. Nuestros hallazgos concuerdan con los reportados por Waiczies S et al<sup>57</sup> en los que la inducción de anergia se asoció con incremento sostenido en pERK1. Sin embargo será necesario corroborar dichos hallazgos mediante la evaluación de p27<sup>Kip1</sup>.

Nuestros hallazgos sugieren que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que sobre-expresan Cbl-b y pre-tratados con ionomicina responden a la re-estimulación antigénica mostrando una expresión diferencial de las vías de activación asociadas a la señalización a través del TCR. La sobre-expresión de Cbl-b y el pre-tratamiento con ionomicina se asoció a incremento en la expresión de p- PKC $\theta$  y p-MAPK y disminución en la vía pAkt-pPI3K. Lo anterior podría estar en relación a múltiples cambios metabólicos que favorecen la señalización a través de PKC $\theta$  y MAPK, los cuales podrían estar relacionados con la regulación de DAG y constituir un mecanismo para el mantenimiento del estado anérgico.

Tomando en cuenta los hallazgos previos en cuanto al incremento de p-MAPK como marcador de anergia, la sobre-expresión de Cbl-b en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG podría asociarse a la reversibilidad del fenómeno de resistencia a anergia.

## 10. CONCLUSIONES

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG muestran un defecto en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b, asociado a la presencia del fenotipo de resistencia a anergia (incremento en la proliferación y síntesis de IL-2). Así mismo, nuestros resultados sugieren que el incremento en la producción de IL-4 e IL-17 y la disminución de IL-10, así como la expresión incrementada de CD69, CD83 y CD40L forman parte del fenotipo de resistencia a anergia en LEG. Por otra parte, el defecto en la expresión de Cbl-b en LEG no depende del estado de diferenciación del linfocito T, pues se encontró tanto en células vírgenes como de memoria efectoras y no depende de la actividad de la enfermedad.

Por otra parte, la sobre-expresión de Cbl-b y el pre-tratamiento con ionomicina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> primarios de controles sanos se asocia a un perfil de expresión diferencial de diversas proteínas fosforiladas asociadas a la señalización del TCR, tales como incremento en la expresión de p-MAPK y p-PKC $\theta$  y una disminución en p-Akt y p-PI3K.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG que sobre-expresan Cbl-b y fueron pre-tratados con ionomicina, muestran incremento en la expresión de p-MAPK y disminución en p-Akt, lo cual sugiere la reversibilidad del fenotipo de resistencia a anergia ante la sobre-expresión de dicha ligasa de ubiquitina.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ciechanover, A., Orian, A. & Schwartz, A.L. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* **22**, 442-451 (2000).
2. Pickart, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-533 (2001).
3. Ciechanover, A., Orian, A. & Schwartz, A.L. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* **77**, 40-51 (2000).
4. Walker, L.S. & Abbas, A.K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* **2**, 11-19 (2002).
5. Macian, F., Im, S.H., Garcia-Cozar, F.J. & Rao, A. T-cell anergy. *Curr Opin Immunol* **16**, 209-216 (2004).
6. Liu, Y.C., Penninger, J. & Karin, M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* **5**, 941-952 (2005).
7. Zhang, J. Ubiquitin ligases in T cell activation and autoimmunity. *Clin Immunol* **111**, 234-240 (2004).
8. Schwartz, R.H. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-334 (2003).
9. Beverly, B., Kang, S.M., Lenardo, M.J. & Schwartz, R.H. Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int Immunol* **4**, 661-671 (1992).
10. Macian, F. *et al.* Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* **109**, 719-731 (2002).
11. Liu, Y.C. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* **22**, 81-127 (2004).
12. Heissmeyer, V. *et al.* Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nature immunology* **5**, 255-265 (2004).
13. Jeon, M.S. *et al.* Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity* **21**, 167-177 (2004).
14. Wells, A.D. *et al.* Regulation of T cell activation and tolerance by phospholipase C gamma-1-dependent integrin avidity modulation. *J Immunol* **170**, 4127-4133 (2003).
15. Naramura, M. *et al.* c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol* **3**, 1192-1199 (2002).
16. Bachmaier, K. *et al.* Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* **403**, 211-216 (2000).
17. Chiang, Y.J. *et al.* Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* **403**, 216-220 (2000).
18. Bottomley, M.J., Stier, G., Pennacchini, D., Legube, G., Simon, B., Akhtar, A., Sattler, M., Musco, G. NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* **280**, 11505-11512 (2005).
19. Tsokos, G.C. & Liossis, S.N. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today* **20**, 119-124 (1999).
20. Tsokos, G.C., Mitchell, J.P. & Juang, Y.T. T cell abnormalities in human and mouse lupus: intrinsic and extrinsic. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 542-547 (2003).

21. Vargas-Rojas, M.I., Crispin, J.C., Richaud-Patin, Y. & Alcocer-Varela, J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* **17**, 289-294 (2008).
22. Choi, J.Y. & Craft, J. Activation of naive CD4+ T cells in vivo by a self-peptide mimic: mechanism of tolerance maintenance and preservation of immunity. *J Immunol* **172**, 7399-7407 (2004).
23. Tsokos, G.C., Wong, H.K., Enyedy, E.J. & Nambiar, M.P. Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol* **12**, 355-363 (2000).
24. Alcocer-Varela, J. & Alarcon-Segovia, D. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **69**, 1388-1392 (1982).
25. Kammer, G.M. Altered regulation of IL-2 production in systemic lupus erythematosus: an evolving paradigm. *J Clin Invest* **115**, 836-840 (2005).
26. Bouzahzah, F., Jung, S. & Craft, J. CD4+ T cells from lupus-prone mice avoid antigen-specific tolerance induction in vivo. *J Immunol* **170**, 741-748 (2003).
27. Yi, Y., McNerney, M. & Datta, S.K. Regulatory defects in Cbl and mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-related kinase) pathways cause persistent hyperexpression of CD40 ligand in human lupus T cells. *J Immunol* **165**, 6627-6634 (2000).
28. Doniz-Padilla, L. *et al.* Expression and function of Cbl-b in T cells from patients with systemic lupus erythematosus, and detection of the 2126 A/G Cblb gene polymorphism in the Mexican mestizo population. *Lupus* **20**, 628-635 (2011).
29. Walsh, B.T. *et al.* SLE in a United States-Mexico Border Community. *J Clin Rheumatol* **7**, 3-9 (2001).
30. Danchenko, N., Satia, J.A. & Anthony, M.S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* **15**, 308-318 (2006).
31. Tan, E.M. *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **25**, 1271-1277 (1982).
32. Guzman, J., Cardiel, M.H., Arce-Salinas, A., Sanchez-Guerrero, J. & Alarcon-Segovia, D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* **19**, 1551-1558 (1992).
33. Arce-Salinas, A., Cardiel, M.H., Guzman, J. & Alcocer-Varela, J. Validity of retrospective disease activity assessment in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology* **23**, 846-849 (1996).
34. Crispin, J., Vargas-Rojas, M. & Alcocer-Varela, J. Cell Proliferation Index. A reliable and validated method that quantifies cell proliferation according to CFSE dilution. *Clin Immunol* **115** (suppl 1), S267 (2005).
35. Schwartz, R.H. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* **184**, 1-8 (1996).
36. Anderson, A.E. *et al.* Differential regulation of naive and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol* **84**, 124-133 (2008).
37. Mirshahidi, S., Huang, C.T. & Sadegh-Nasseri, S. Anergy in peripheral memory CD4(+) T cells induced by low avidity engagement of T cell receptor. *J Exp Med* **194**, 719-731 (2001).
38. Mueller, D.L. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol* **5**, 883-890 (2004).
39. Schartner, J.M., Fathman, C.G. & Seroogy, C.M. Preservation of self: An overview of E3 ubiquitin ligases and T cell tolerance. *Semin Immunol* **19**, 38

- 188-196 (2007).
40. Linker-Israeli, M. *et al.* Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immunol* **130**, 2651-2655 (1983).
  41. Richaud-Patin, Y., Alcocer-Varela, J. & Llorente, L. High levels of TH2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. *Rev Invest Clin* **47**, 267-272 (1995).
  42. Crispin, J.C., Martinez, A., de Pablo, P., Velasquillo, C. & Alcocer-Varela, J. Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* **48**, 196-200 (1998).
  43. Horwitz, D.A. *et al.* Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type cytokines in patients with recent-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **41**, 838-844 (1998).
  44. Tsokos, G.C. Calcium signaling in systemic lupus erythematosus lymphocytes and its therapeutic exploitation. *Arthritis Rheum* **58**, 1216-1219 (2008).
  45. Cedeno, S. *et al.* Defective activity of ERK-1 and ERK-2 mitogen-activated protein kinases in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus: potential role of altered coupling of Ras guanine nucleotide exchange factor hSos to adapter protein Grb2 in lupus T cells. *Clin Immunol* **106**, 41-49 (2003).
  46. Drappa, J. *et al.* Impaired T cell death and lupus-like autoimmunity in T cell-specific adapter protein-deficient mice. *J Exp Med* **198**, 809-821 (2003).
  47. Juang, Y.T. *et al.* Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest* **115**, 996-1005 (2005).
  48. Kammer, G.M., Laxminarayana, D. & Khan, I.U. Mechanisms of deficient type I protein kinase A activity in lupus T lymphocytes. *Int Rev Immunol* **23**, 225-244 (2004).
  49. Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Barber, D.L. & Nadler, L.M. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* **278**, 124-128 (1997).
  50. Liossis, S.N., Sfrikakis, P.P. & Tsokos, G.C. Immune cell signaling aberrations in human lupus. *Immunol Res* **18**, 27-39 (1998).
  51. Quill, H. *et al.* Anergic Th1 cells express altered levels of the protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *J Immunol* **149**, 2887-2893 (1992).
  52. Murakawa, Y. & Sakane, T. Deficient phytohemagglutinin-induced interleukin-2 activity in patients with inactive systemic lupus erythematosus is correctable by the addition of phorbol myristate acetate. *Arthritis Rheum* **31**, 826-833 (1988).
  53. Dure, M. & Macian, F. IL-2 signaling prevents T cell anergy by inhibiting the expression of anergy-inducing genes. *Mol Immunol* **46**, 999-1006 (2009).
  54. Villarino, A.V. *et al.* Posttranscriptional silencing of effector cytokine mRNA underlies the anergic phenotype of self-reactive T cells. *Immunity* **34**, 50-60 (2011).
  55. Thomas, R.M., Saouaf, S.J. & Wells, A.D. Superantigen-induced CD4+ T cell tolerance is associated with DNA methylation and histone hypo-acetylation at cytokine gene loci. *Genes Immun* **8**, 613-618 (2007).
  56. Crispin, J.C. *et al.* Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol* **181**, 8761-8766 (2008).

57. Waiczies, S. *et al.* Atorvastatin induces T cell anergy via phosphorylation of ERK1. *J Immunol* **174**, 5630-5635 (2005).
58. Zhang, R., Zhang, N. & Mueller, D.L. Casitas B-lineage lymphoma b inhibits antigen recognition and slows cell cycle progression at late times during CD4+ T cell clonal expansion. *J Immunol* **181**, 5331-5339 (2008).
59. Lineberry, N.B. *et al.* Cutting edge: The transmembrane E3 ligase GRAIL ubiquitinates the costimulatory molecule CD40 ligand during the induction of T cell anergy. *J Immunol* **181**, 1622-1626 (2008).
60. Su, L.L., Iwai, H., Lin, J.T. & Fathman, C.G. The transmembrane E3 ligase GRAIL ubiquitinates and degrades CD83 on CD4 T cells. *J Immunol* **183**, 438-444 (2009).
61. DeSilva, D.R., Feeser, W.S., Tancula, E.J. & Scherle, P.A. Anergic T cells are defective in both jun NH2-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Exp Med* **183**, 2017-2023 (1996).
62. Li, W., Whaley, C.D., Mondino, A. & Mueller, D.L. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* **271**, 1272-1276 (1996).
63. Migita, K. *et al.* Defective TCR-mediated signaling in anergic T cells. *J Immunol* **155**, 5083-5087 (1995).
64. Adler, H.S. & Steinbrink, K. MAP kinase p38 and its relation to T cell anergy and suppressor function of regulatory T cells. *Cell Cycle* **7**, 169-170 (2008).
65. Li, T. *et al.* Matrine induces cell anergy in human Jurkat T cells through modulation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor of activated T-cells signaling with concomitant up-regulation of anergy-associated genes expression. *Biol Pharm Bull* **33**, 40-46 (2010).
66. Bauer, P.M., Buga, G.M. & Ignarro, L.J. Role of p42/p44 mitogen-activated-protein kinase and p21waf1/cip1 in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12802-12807 (2001).
67. Boussiotis, V.A. *et al.* p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nat Med* **6**, 290-297 (2000).
68. Jackson, S.K., DeLoose, A. & Gilbert, K.M. Induction of anergy in Th1 cells associated with increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Cip1 and p27Kip1. *J Immunol* **166**, 952-958 (2001).
69. Penton-Rol, G. *et al.* C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* **11**, 29-38 (2011).

## AGRADECIMIENTOS

La realización de este proyecto como tesis doctoral fue posible gracias al apoyo recibido por CONACYT (37950,84769).

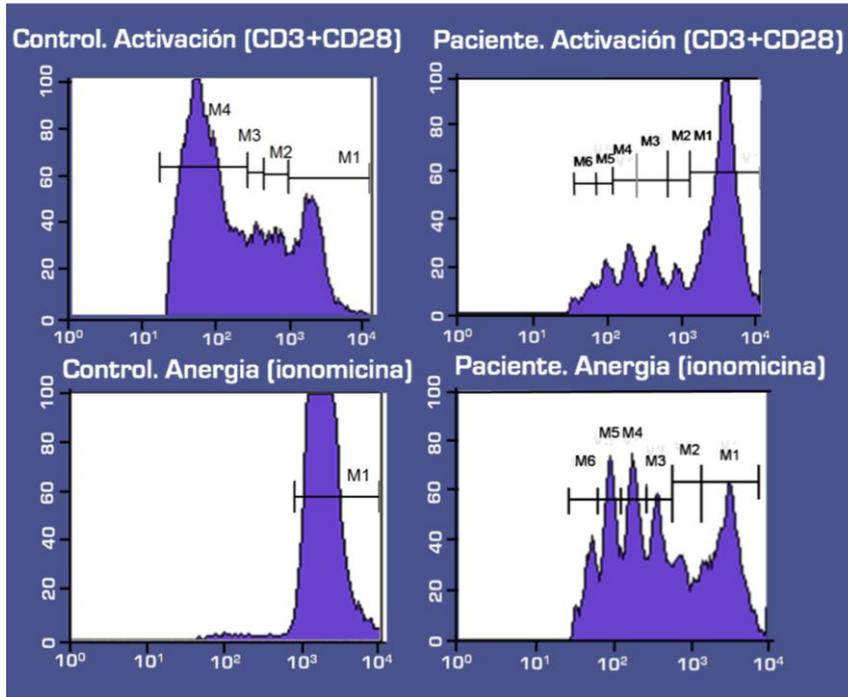
## 12. ANEXOS

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes con LEG.

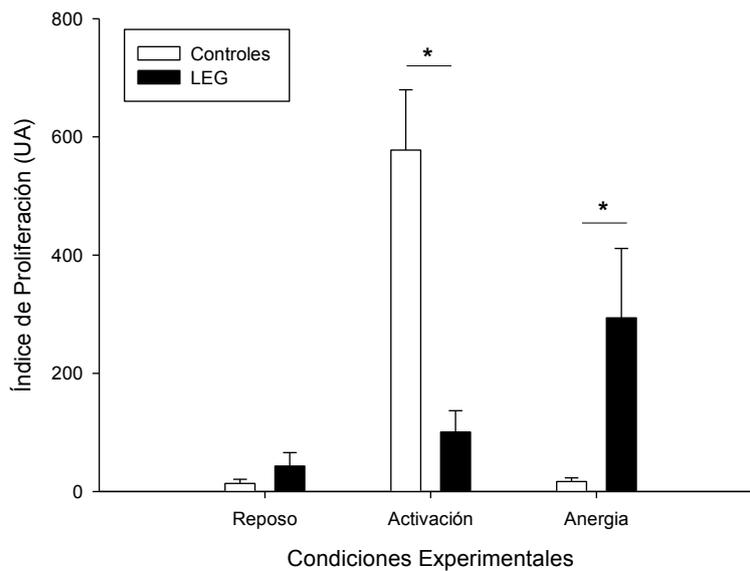
Variable	Media $\pm$ DE ó Frecuencia
Edad <sup>69</sup>	35.4 $\pm$ 7.5
Género Femenino	17/20
Tiempo de diagnóstico <sup>69</sup>	8 $\pm$ 2.2
Tiempo en remisión <sup>69</sup>	5 $\pm$ 1.8
SLEDAI (puntos)	12 $\pm$ 3.3

**Figura 1. Proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y de controles ante la inducción de anergia.**

**A**

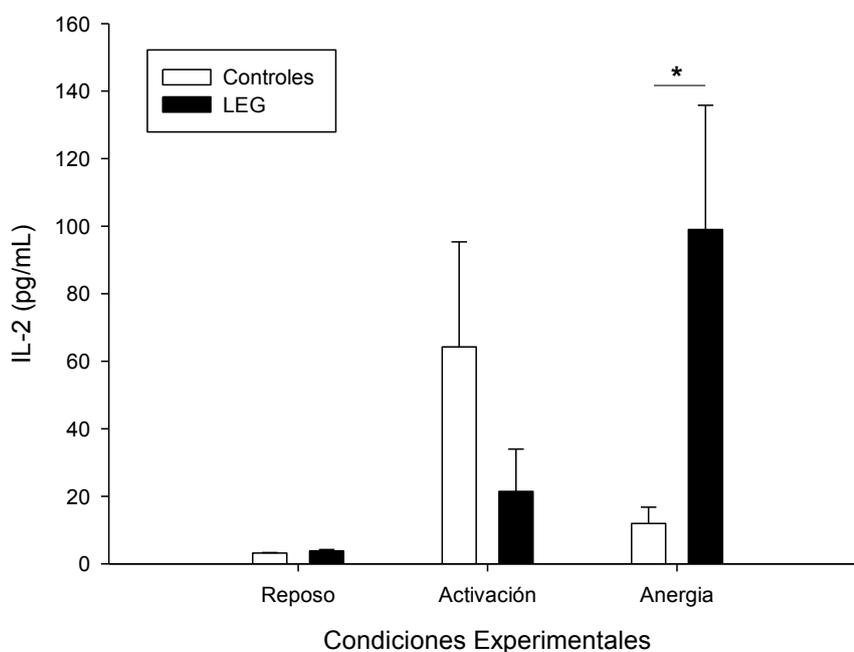


**B**



Las células T CD4<sup>+</sup> de 20 pacientes con LEG y 20 controles sanos fueron aisladas y estimuladas con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 soluble (2.5 µg/ml) o Ionomicina 1 µM por 18 hs (primer estímulo), posteriormente se lavaron y dejaron en reposo por 48 horas y posterior se re-estimularon en las mismas condiciones del primer estímulo, pero por 96 horas. Posterior a lo cual, las células fueron cosechadas y se evaluó la respuesta proliferativa mediante CFSE por citometría de flujo. A) Imagen representativa de 3 diferentes experimentos. B) Datos acumulados del índice de proliferación de los 20 sujetos por grupo. \*  $p < 0.05$  LEG vs controles sanos.

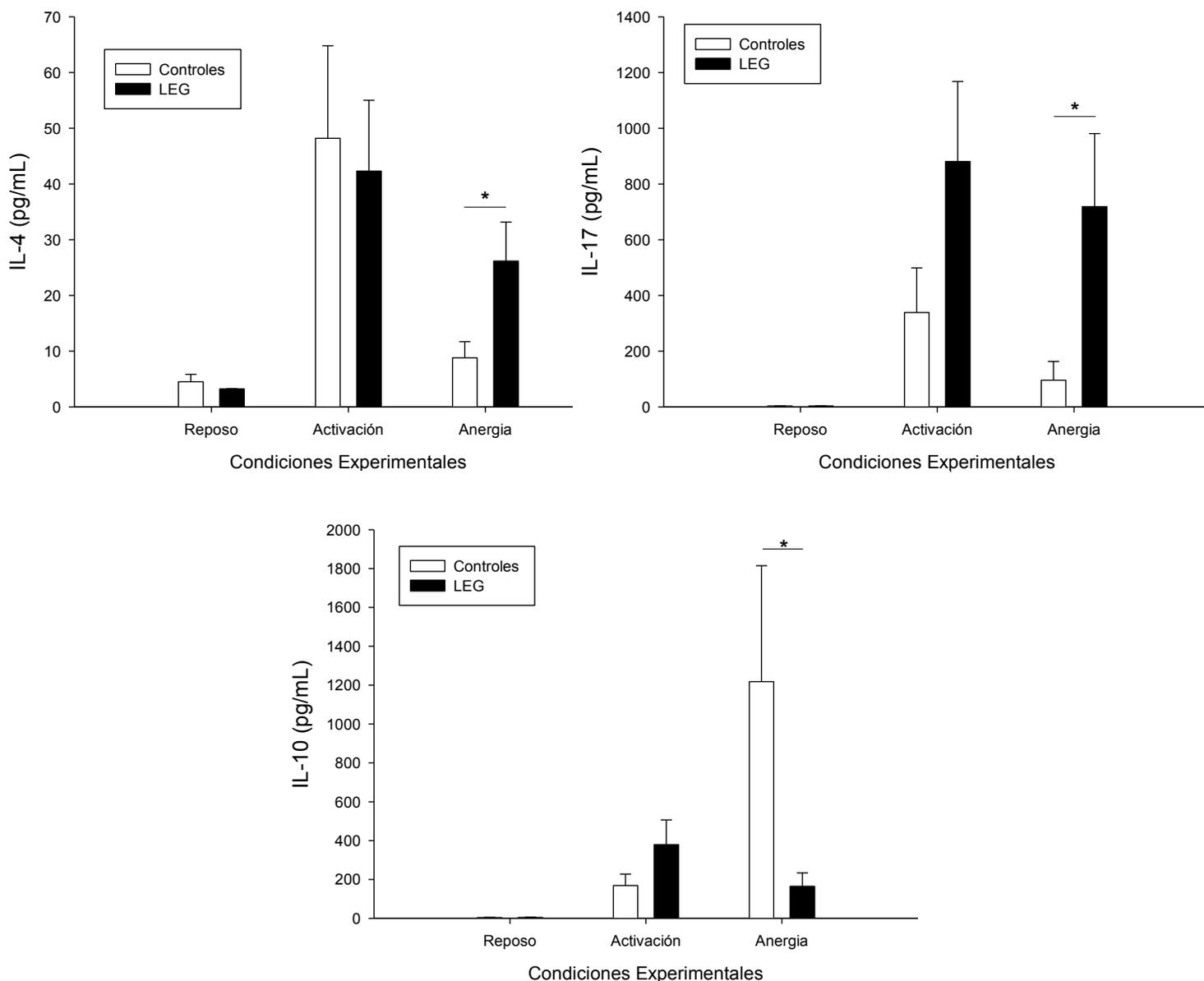
**Figura 2. Producción de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y de controles ante la inducción de anergia.**



Las células T CD4<sup>+</sup> de 20 pacientes con LEG y 20 controles sanos fueron aisladas y estimuladas con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 soluble (2.5 µg/ml) o Ionomicina 1 µM por 18 hs (primer estímulo), posteriormente se lavaron y dejaron en reposo por 48 horas y luego se re-estimularon en las mismas condiciones del primer estímulo, pero por 96 horas. Posterior a lo cual, las células fueron cosechadas y se evaluó la producción de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante luminometría ante las diferentes condiciones experimentales.

\*  $p < 0.05$  LEG vs controles sanos.

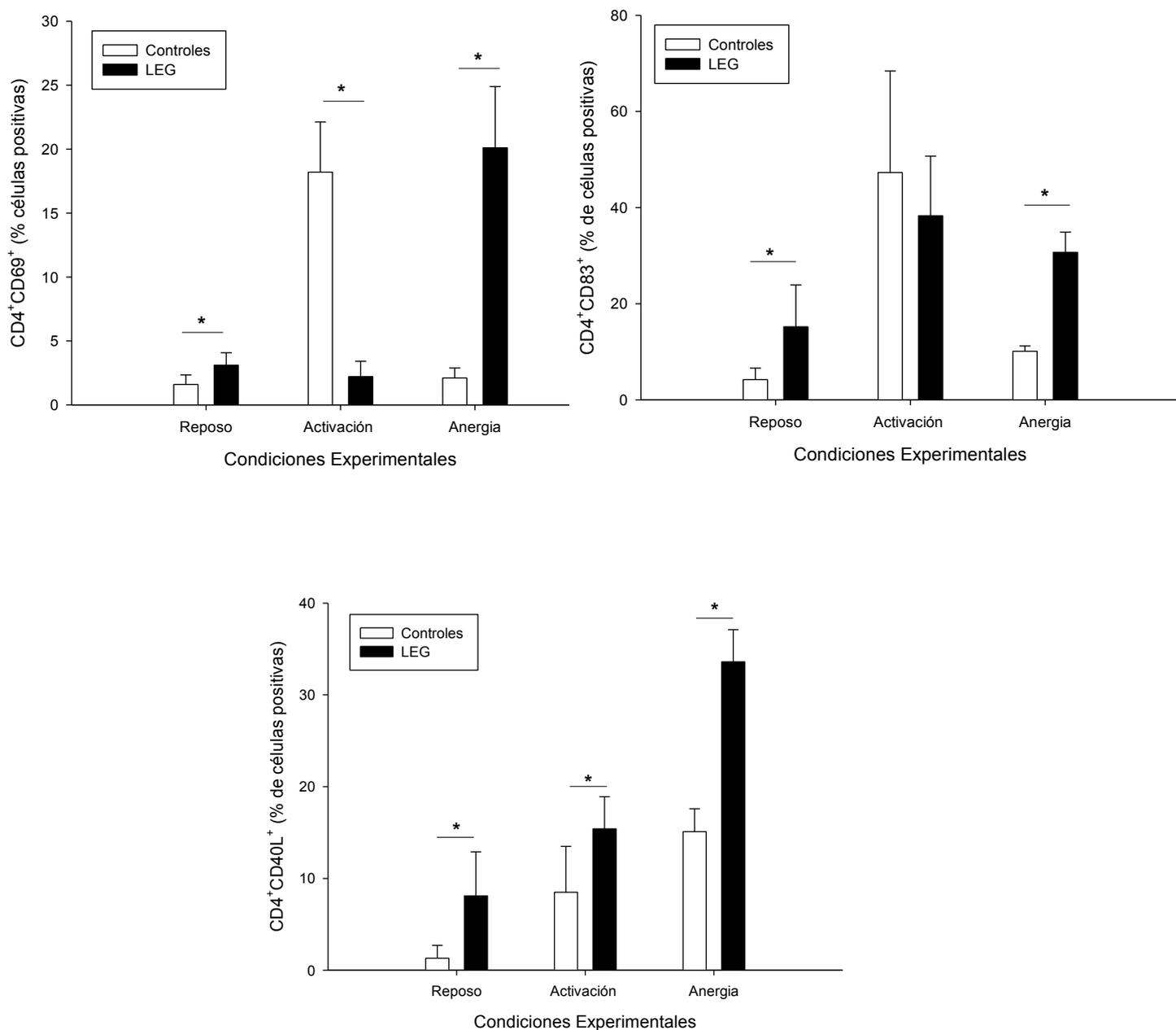
**Figura 3. Producción de citocinas pro-inflamatorias y supresoras en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y de controles ante la inducción de anergia.**



Las células T CD4<sup>+</sup> de 20 pacientes con LEG y 20 controles sanos fueron aisladas y estimuladas con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 soluble (2.5 µg/ml) o ionomicina 1µM por 18 hs (primer estímulo), posteriormente se lavaron y dejaron en reposo por 48 horas y luego se re-estimularon en las mismas condiciones del primer estímulo, pero por 96 horas. Posterior a lo cual, las células fueron cosechadas y se evaluó la producción de IL-4, IL-17A e IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante luminometría ante las diferentes condiciones experimentales.

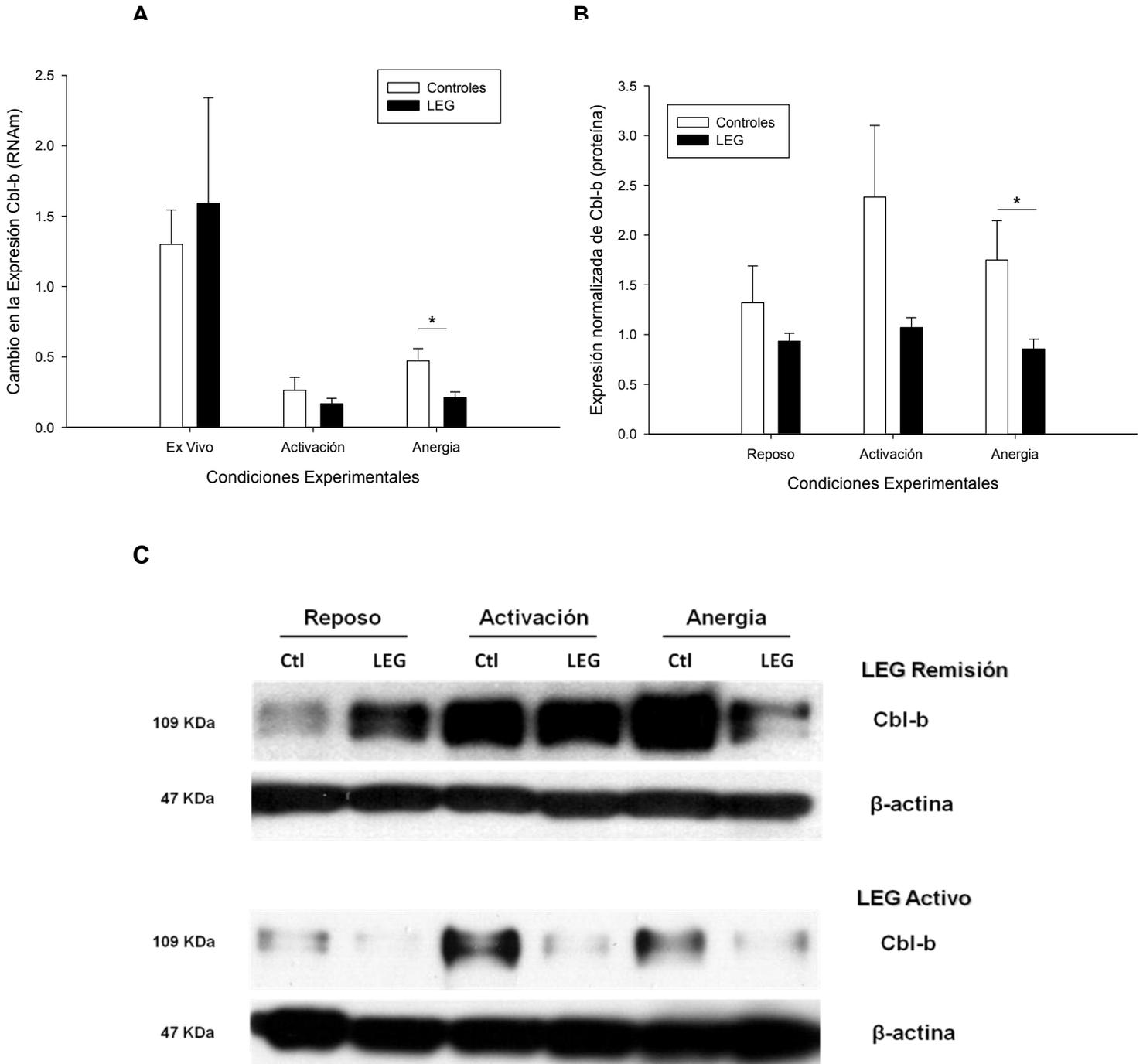
\*  $p < 0.05$  LEG vs controles sanos.

**Figura 4. Expresión de marcadores de activación (CD69, CD83) y co-estimulación (CD40L) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y de controles ante la inducción de anergia.**



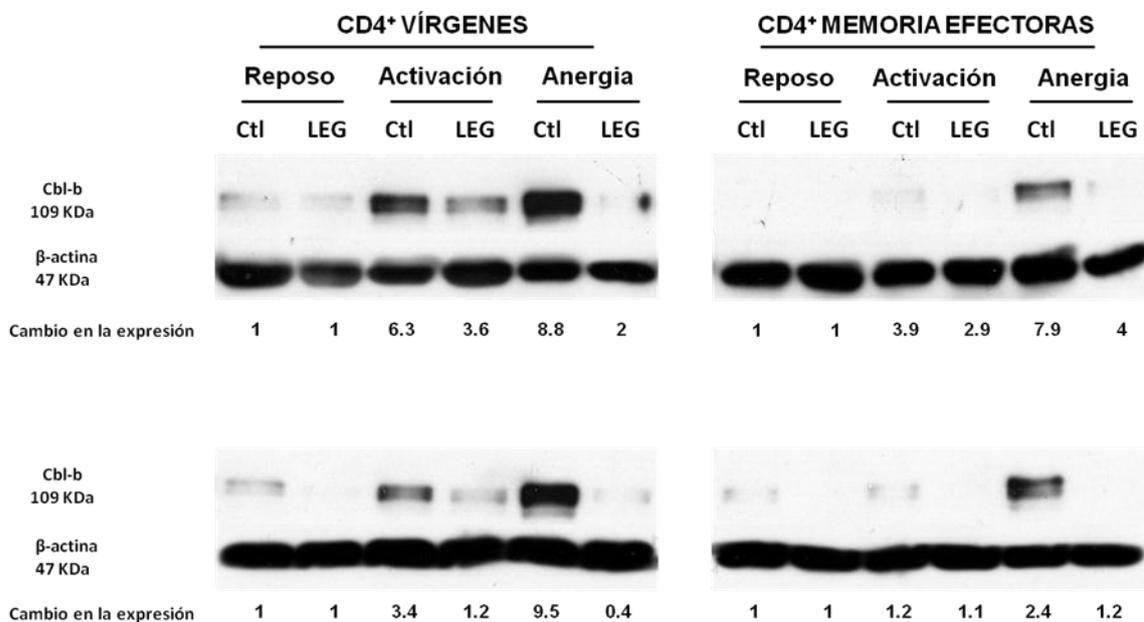
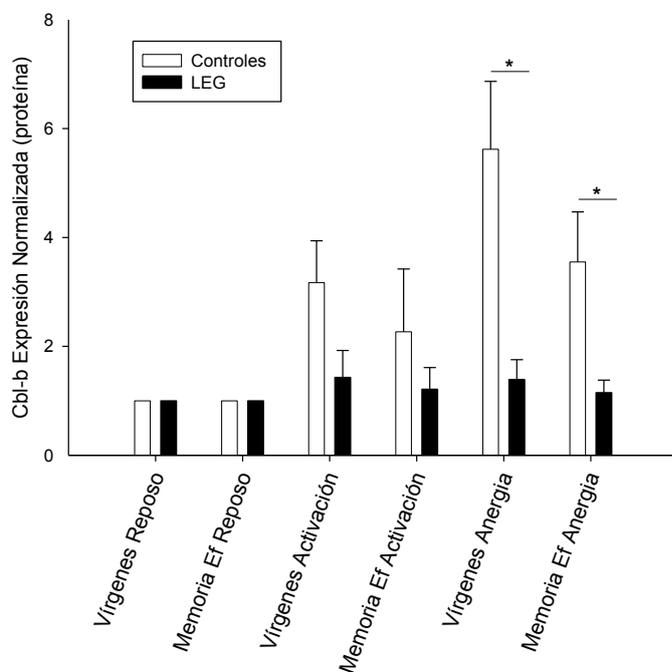
Las células T CD4<sup>+</sup> de 20 pacientes con LEG y 20 controles sanos fueron aisladas y estimuladas con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 soluble (2.5 µg/ml) o ionomicina 1 µM por 18 hs (primer estímulo), posteriormente se lavaron y dejaron en reposo por 48 horas y posterior se re-estimularon en las mismas condiciones del primer estímulo, pero por 96 horas. Posterior a lo cual, las células fueron cosechadas y se evaluó la expresión de CD69, CD83 y CD40 L por citometría de flujo. Se presentan los porcentajes de células positivas para dichos marcadores. \*  $p < 0.0545$  LEG vs controles sanos.

**Figura 5. Expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y de controles ante el protocolo anergizante.**



Las células T CD4<sup>+</sup> de 20 pacientes con LEG y 20 controles sanos fueron aisladas y estimuladas con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 soluble (2.5 µg/ml) o Ionomicina 1 µM por 18 hs (primer estímulo), posterior a lo cual se cosecharon y se lisaron. Se evaluó la expresión de Cbl-b mediante A) PCR en tiempo real y B) Western Blot. C) Imagen representativa de WB para Cbl-b de lisados de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y controles sanos ante las diferentes condiciones experimentales. \*  $p < 0.05$  LEG vs controles sanos.

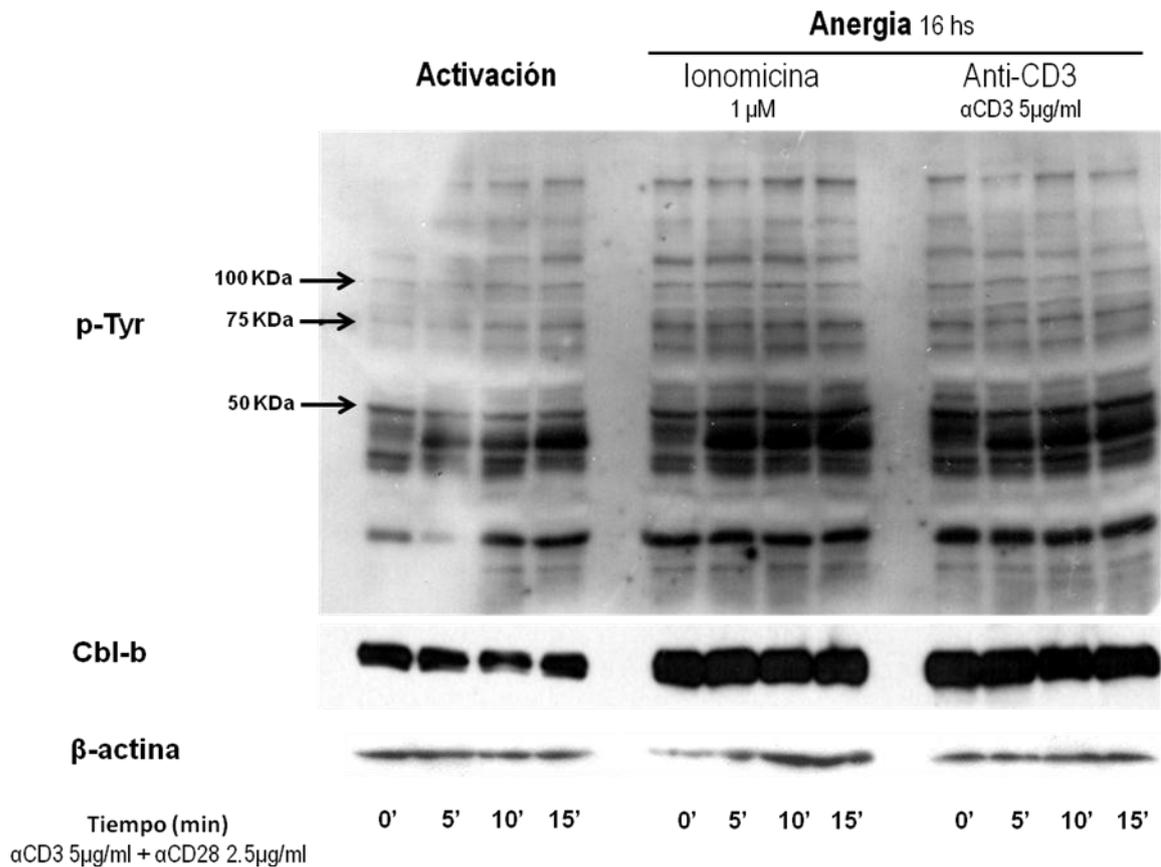
**Figura 6. Expresión de Cbl-b en células vírgenes y de memoria efectoras en pacientes con LEG y en controles ante el protocolo anergizante.**



Se purificaron células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y de memoria efectoras de 6 pacientes con LEG y 6 controles sanos fueron aisladas y estimuladas con anti-CD3 (5 µg/ml) unido a placa y anti-CD28 soluble (2.5 µg/ml) o Ionomicina 1 µM por 18 hs (primer estímulo), posterior a lo cual se cosecharon y se lisaron. Se evaluó la expresión de Cbl-b mediante A) Western Blot. B) Imagen representativa de WB para Cbl-b de lisados de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes y de memoria efectoras de pacientes con LEG y controles sanos ante las diferentes condiciones experimentales. \*  $p < 0.05$  LEG vs 47

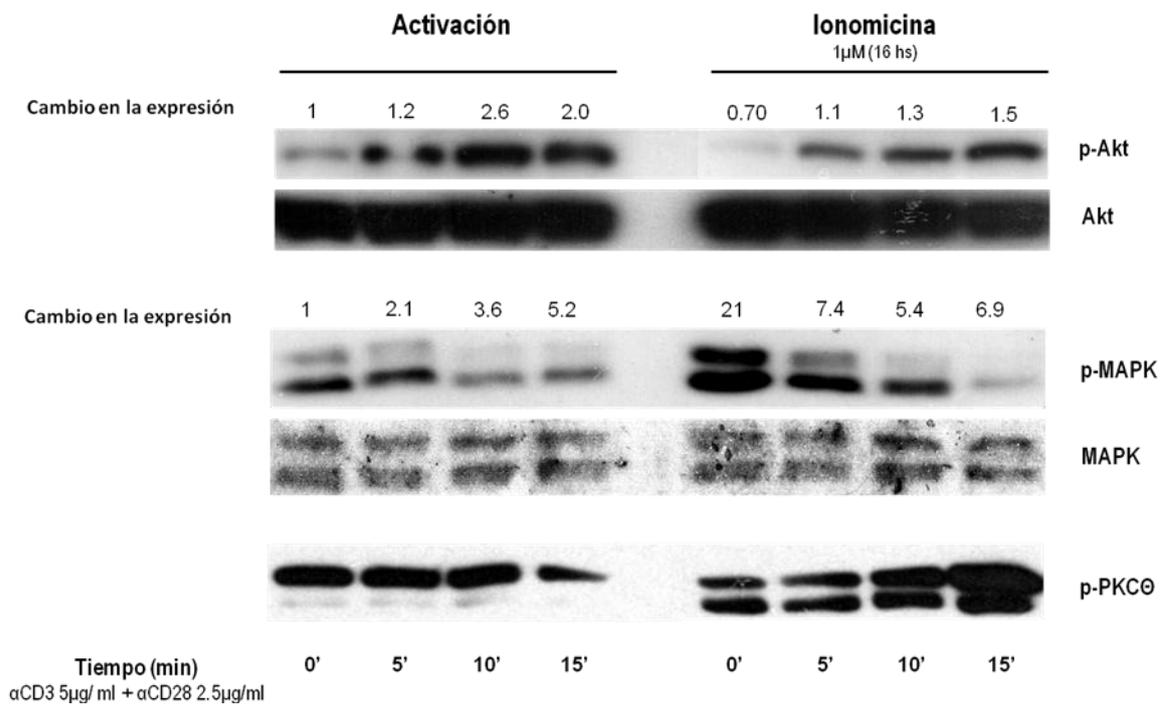
controles sanos.

**Figura 7. Perfil de fosforilación global en linfocitos T CD4+ primarios humanos ante diferentes condiciones experimentales.**



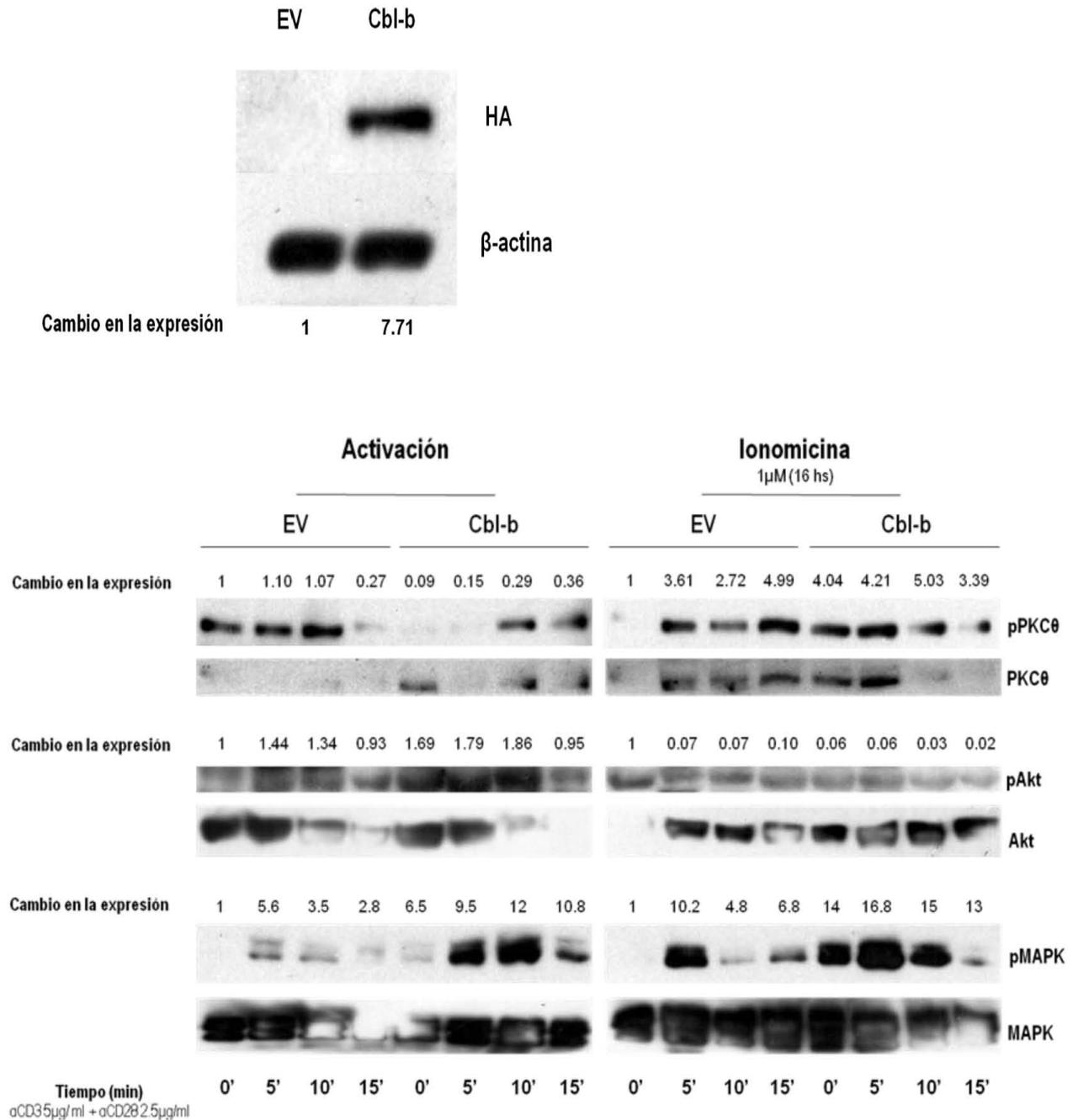
Las células T CD4<sup>+</sup> de controles sanos fueron aisladas y estimuladas con anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) unido a placa y anti-CD28 soluble (2.5  $\mu$ g/ml); lonomicina 1  $\mu$ M o anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) unido a placa en ausencia de anti-CD28 por 18 hs (primer estímulo), posterior a lo cual se cosecharon y se lavaron. Posteriormente fueron re-estimuladas con anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) y anti-CD28 solubles (2.5  $\mu$ g/ml) a tiempos cortos (5', 10', 15'). Posterior a lo cual las células fueron lisadas y se evaluó la expresión de las proteínas de interés (cbl-b) y el perfil de fosforilación global de p-Tyr mediante Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 5 experimentos.

**Figura 8. Cinética de proteínas fosforiladas asociadas al TCR en linfocitos T CD4+ primarios humanos ante diferentes condiciones experimentales.**



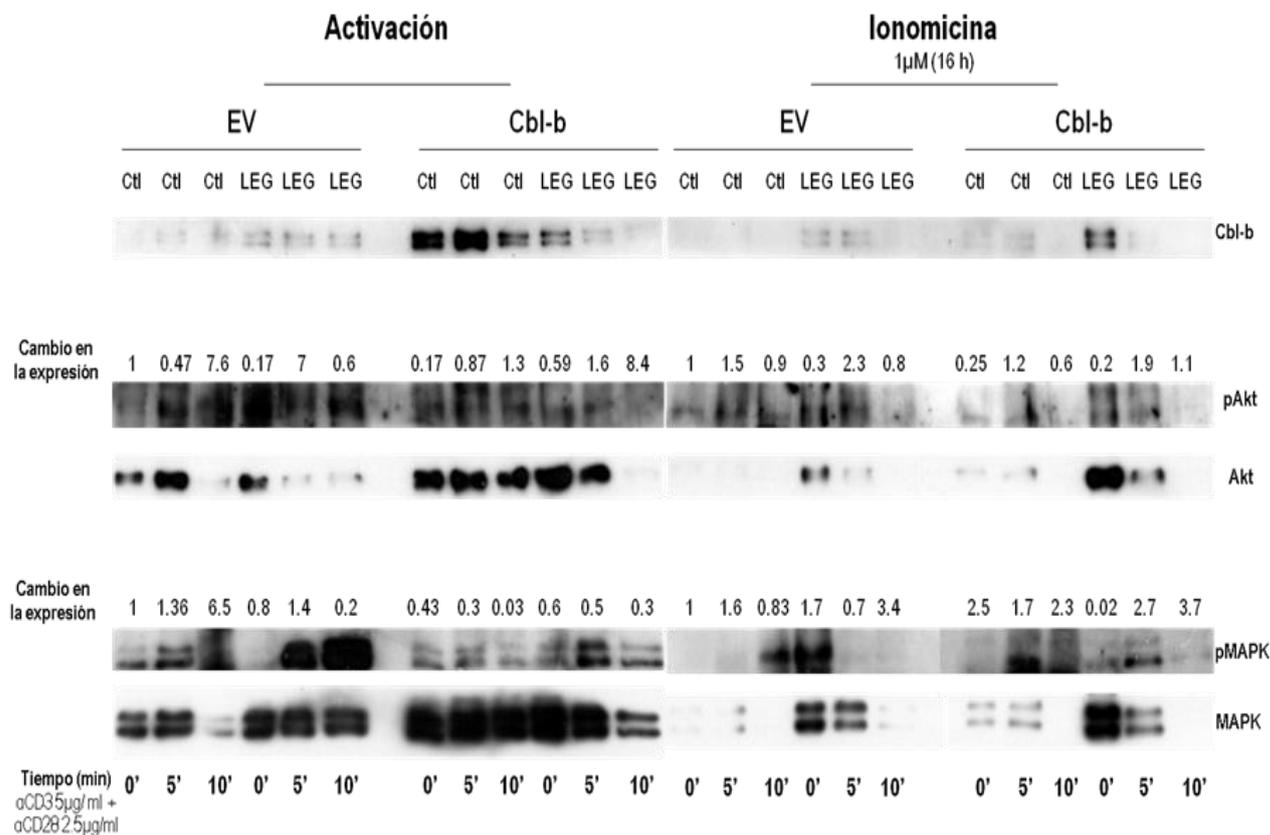
Las células T CD4<sup>+</sup> de controles sanos fueron aisladas y estimuladas con anti-CD3 (5 μg/ml) unido a placa y anti-CD28 soluble (2.5 μg/ml); Ionomicina 1 μM o anti-CD3 (5 μg/ml) unido a placa en ausencia de anti-CD28 por 18 hs (primer estímulo), posterior a lo cual se cosecharon y se lavaron. Posteriormente fueron re-estimuladas con anti-CD3 (5 μg/ml) y anti-CD28 solubles (2.5 μg/ml) a tiempos cortos (5', 10', 15'). Posterior a lo cual las células fueron lisadas y se evaluó la expresión de las proteínas de interés mediante Western Blot. Se muestra una imagen representativa de 8 experimentos.

**Figura 9. Activación de PKC- $\theta$ , Akt y MAPK (ERK1/2) dependientes de la regulación mediada por Cbl-b en linfocitos T CD4<sup>+</sup> primarios humanos.**



Las células T CD4<sup>+</sup> de controles sanos fueron aisladas y transfectadas con el plásmido p-CEFL-Cblb-HA o vector vacío. Fueron pretratadas con ionomicina 1 $\mu$ M o RPMI mediante 18 horas y a las 48 horas post-transfección fueron cosechadas y re-estimuladas con anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) y anti-CD28 solubles (2.5  $\mu$ g/ml) a los tiempos indicados. Posteriormente las células fueron lisadas y se evaluó la expresión de las proteínas de interés mediante western blot. A) Eficiencia de la transfección evaluada mediante WB para HA y B) Cinética de las proteínas fosforiladas asociadas al TCR. Se muestra una imagen representativa de 6 experimentos.

**Figura 10. Reversibilidad de las alteraciones en la activación de Akt y MAPK (ERK1/2) posterior a la sobre-expresión de Cbl-b en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG.**



Las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LEG y controles sanos fueron aisladas y transfectadas con el plásmido p-CEFL-Cblb-HA o el vector vacío. Fueron pretratadas con ionomicina 1 $\mu$ M o RPMI durante 18 horas y a las 48 horas post-transfección fueron cosechadas y re-estimuladas con anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) y anti-CD28 solubles (2.5  $\mu$ g/ml) a los tiempos indicados. Posteriormente las células fueron lisadas y se evaluó la expresión de las proteínas de interés mediante western blot. Se muestra una imagen representativa de 5 experimentos.

## **13. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

**13.1 Quantitative and functional profiles of CD4+ lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. Clin Exp Immunol 2011 April; 164(1):17-25.**

**13.2 Follicular helper T cells poise immune responses to the development of autoimmune pathology. Autoimmun Rev 2011; April 10 (6): 325-30.**

**13.3 Early growth response transcription factors and the modulation of immune response: Implications towards autoimmunity. Autoimmunity Reviews 2010; 9: 454-8.**

**13.4 Interleukin 2 and systemic lupus erythematosus. Beyond the transcriptional regulatory net abnormalities. Autoimmunity Reviews 2009; Sep 9 (1):34-9.**

**13.5 Ubiquitination system and autoimmunity: The bridge towards the modulation of the immune response. Autoimmunity Reviews 2008; 7: 284-90.**