



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

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

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRIM21 EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE PACIENTES CON MIOPATÍAS
INFLAMATORIAS**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD EN

REUMATOLOGÍA

PRESENTA

**DRA. ANGELES SHUNASHY GALINDO
FERIA**

TUTORES

DRA. DIANA GÓMEZ MARTÍN

DR. JORGE CARLOS ALCOCER VARELA

MEXICO

AGOSTO 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

1. Antecedentes
 - 1.1 Marco teórico.
2. Planteamiento del problema.
3. Justificación.
4. Objetivos.
5. Hipótesis.
6. Pacientes y Métodos.
7. Análisis Estadístico.
8. Resultados.
9. Discusión.
10. Conclusiones.
11. Tablas, gráficas y figuras.
12. Referencias.

ANTECEDENTES

1. MARCO TEÓRICO

La superfamilia TRIM es un conjunto de proteínas que están compuestas por un multidominio de ligasa E3 de ubiquitina(1) caracterizada por la presencia de un motivo tripartita RBCC en el extremo amino-terminal (N-terminal). El motivo tripartita está compuesto por un dominio RING (Really Interesting New Gene), una o dos cajas B (B box) y una hélice superenrollada (Coiled coil) (2;3). Estas 3 estructuras están organizadas siempre en el mismo orden desde el extremo carboxilo-terminal (C-terminal) al N-terminal.

Esta conformación es compartida aproximadamente por 70 proteínas, los cuales se pueden clasificar en 11 subgrupos basados en sus diferentes estructuras de las regiones C-terminal, siendo el dominio expresado más frecuentemente el correspondiente a PRY-SPRY (presente en el 75% de las proteínas TRIM) que permite su participación en procesos como ubiquitinación y similares a ubiquitinación (por ejemplo: ISGylación y SUMOylación).

En cuanto a la estructura RING, los residuos conservados de Cisteína (Cys) e histidina (His) coinciden para mantener la organización entrelazada a través de la unión de 2 átomos de Zinc (Zn^{2+}). El dominio RING juega un papel importante en la ubiquitinación al unir enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) (4), y fue descrito por primera vez en la proteína CBL, la cual es una ligasa E3 de ubiquitina involucrada en la señalización celular y ubiquitinación de proteínas. (1)

Las cajas B1 y B2 presentan distintos tipos de arreglos de Cys e His. Su papel es desconocido pero se requiere la integridad para la funcionalidad de las proteínas TRIM. En cuanto al CC, se encuentra involucrado en la(s) homo o hetero-interacciones que promueven la formación de complejos moleculares de alto peso.

En general, las proteínas TRIM se encuentran involucradas en un amplio rango de funciones moleculares tales como reguladores transcripcionales, modificaciones postraduccionales (apoptosis, diferenciación celular, desarrollo, oncogénesis, etc.)(5), sensores de daño intracelular con actividad antiviral (identificación de RNAs o RNAs) (6) regulación de la inmunidad innata y adaptativa(7-9). Contribuye a la respuesta innata de HIV (10) así como parte de la organogénesis (TRIM18 y síndrome de Opitz, TRIM32 y TRIM63)(11;12).

Hasta el momento se ha identificado que las proteínas TRIM correspondientes al grupo 4 tienen un papel importante en la inmunidad innata tales como TRIM11 y TRIM21 (ubiquitinación), TRIM25 (ISGylación), TRIM19 y TRIM63 (SUMOylación)(13;14). De las proteínas mencionadas, TRIM21 juega un papel esencial para la neutralización viral intracelular y regulador de procesos inflamatorios, por lo que es importante estudiar su expresión y asociación en enfermedades autoinmunes.

ESTRUCTURA, PATRONES DE EXPRESIÓN DE TRIM21 Y SU ASOCIACIÓN CON INMUNIDAD INNATA

En 1991, dos grupos independientes dirigidos por Chan E (15) e Itoh K(16) clonaron el DNAC de TRIM21 humano, una proteína de 475 aminoácidos y 52 kDa (también denominado Ro52) localizado en el cromosoma 11p15.5 11.

La región N-terminal de TRIM21 tiene el dominio RING (aminoácidos 15-58) con dos sitios de unión Zn^{2+} y el dominio B-box (aa 91-128) con un sitio de unión Zn^{2+} (15). La parte intermedia de la proteína, la cual incluye un cierre de leucina, tiene una estructura CC (aa 125-235). El extremo C-terminal de TRIM21 contiene un dominio PRY/SPRY (aa 286-465; también referido como B30.2) que se encuentra en otras proteínas TRIM.(17)

Los estudios de James LC(18) et al y Keeble AH et al(19) mostraron que TRIM21 es una proteína que se encuentra altamente conservada en mamíferos, e identificaron 4

residuos de alta afinidad localizados en la región PRY-SPRY del dominio CC que permite la unión de ambas cadenas de IgG de manera simultánea. De esta manera TRIM21 funciona como receptor Fc, de características distintivas estructurales y mecánicas, que no es compartido por otros miembros de la familia de las inmunoglobulinas(20)

TRIM21 ha sido ampliamente documentada como proteína inducible por interferón (IFN) en diversos tipos de células. La expresión de TRIM21 también es inducida por infecciones virales y la señalización a través de receptores tipo Toll (TLR). Los estudios *in vitro* ha demostrado que en células en reposo HeLa, TRIM21 se encuentra en el citoplasma y posterior a la inducción con IFN- α es traslocado hacia el núcleo.(21) Los estudios subsecuentes de co-localización mostraron que TRIM21 se encuentra expresado manera constitutiva en el citosol de las células, especialmente de macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T.(6)

También, se ha demostrado que TRIM21 se trasloca a las vesículas apoptóticas y se asocia a la membrana plasmática en las células endoteliales. En queratinocitos, TRIM21 se trasloca desde el citoplasma a la superficie de la célula en respuesta a la luz UV, estrés oxidativo, el óxido nítrico (NO) o tratamiento con estradiol.(17)

Los estudios reportados que han analizado la expresión, el comportamiento de TRIM21 y su asociación con inmunidad innata son escasos, la mayoría de ellos realizados en modelos murinos (22;23). De los reportes más representativos se encuentra el de Reymond A et al, que describe mediante los estudios realizados por *hibridación in situ* (17) como TRIM21 se expresa de forma ubicua con alta expresión en células T, células NK, macrófagos y células dendríticas; pero más bajos en las células B y granulocitos (24). Dentro de los subconjuntos de células dendríticas (DC), los niveles de TRIM21 fueron más altos en las DC convencionales (cDCs) que en las CD plasmocitoides (pDCs); con mayor concentración de TRIM21 en ganglios linfáticos, el bazo y el timo. (22)

ACTIVACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

TRIM21 tiene un papel emergente en la regulación de citocinas, incluyendo IFN tipo I. (25). Además de mediar la vía de neutralización que inhibe directamente la infección viral, el reconocimiento de TRIM21 de patógenos cubiertos por IgM o IgG activa la inmunidad innata(26) mediante 3 vías principales: NFκB, AP-1 y Factores reguladores de interferón (IRF3, IRF5 e IRF7) demostrado en el estudio de Ewan et al. La activación de estas vías conduce a una regulación potente del aumento de secreción de citocinas proinflamatorias (TNFα, IFNβ).

Por otro lado, Yoshimi et al encontraron un incremento en la actividad de NFκB en fibroblastos embrionicos de ratones Trim21^{-/-}, sugiriendo una actividad de regulador negativo en estas células. Se reportó que TRIM21 reduce la señalización NfκB mediante la mono-ubiquitinación de IKKB(27)

El papel del factor de transcripción IRF3 es importante en la inducción de IFN tipo I, especialmente en la respuesta ante una infección viral y/o bacteriana. Se ha demostrado que IRF3 juega un papel importante en la degradación post-viral, mediada por ubiquitinación, de la respuesta de IFN-β. En particular, TRIM-21 identifica a IRF-3 para su degradación posterior a la activación de reconocimiento de patógenos. Higgs et al(28) demostraron que TRIM21 interactúa con IRF3 a través de su dominio C-terminal SPRY, lo que conlleva a la poli-ubiquitinación, degradación proteasomal del factor de transcripción e inhibición del promotor de IFN-β. Este estudio también mostró que la ubiquitinación de IRF3 a través de TRIM21 es por la estimulación de TLR3 y TLR4, lo que conduce a su degradación en el proteosoma y una regulación negativa de IFN tipo I.

Por otro lado, Yang et al(29) reportó la estabilización de IRF3 a partir de TRIM21 al interferir con la interacción entre la peptidil-prolil-cis/ trans-isomerasa, NIMA-1 e IRF3; mejorando así la fuerza y la duración de la respuesta antiviral primaria.

La ubiquitinación de IRF7 por TRIM21 fue estudiado por el grupo de Higgs y Espinosa(30) en células HeLa estimuladas con polyI:C, lipopolisacáridos, imiquimod o CpG-B. En los inmunoprecipitados de los lisados celulares se detectó una asociación por inmunoblott entre TRIM21 e IRF7, la cual fue mayor y más sostenida en las células estimuladas vs no estimuladas (estímulo de TLR7 o TLR9), lo que resultó en una disminución de la producción de IFN - α (30).

De igual manera se identificó que IRF8 juega un papel importante para el desarrollo y función de macrófagos a través de la inducción de genes de citocinas (incluyendo IL-12p40). Los estudios murinos *in vivo* e *in vitro* realizados por Kong (31) reportaron que IRF8 es ubiquitinado por TRIM21 en ambos modelos experimentales, lo cual aumenta la expresión del gen de IL-12p40. Esta respuesta asociada a un aumento en la expresión de TRIM21 tiene la capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria excesiva y de esta manera, contribuir al desarrollo de patología autoinmune.

La interacción de p62 (sequestosoma-1) ha demostrado interactuar con TRIM21 e IRF8, lo que conduce a un aumento de poli-ubiquitinación y la desestabilización de IRF8 en macrófagos estimulados que resulta en la atenuación de la expresión de IL-12p40(32).

El análisis del comportamiento e interacción de TRIM21 con IRF3, IRF5 e IRF8; así como su relación con la producción de citocinas fue realizado en un modelo murino por el grupo de Espinosa et al.(33) Para identificar la expresión del reportero de TRIM21/Ro52 en el modelo experimental Ro52^{-/-} se insertó un cassette reportero IRES-GFP en el locus de Ro52 en ratones deficientes de la misma, se demostró que la mayor expresión de *Trim21* se encontraba en los compartimentos linfoides de bazo, ganglios linfáticos y timo; con alta expresión en linfocitos B (CD19), T (CD3) y macrófagos (CD11b).

En este modelo, los ratones Ro52^{-/-} tenían una producción aumentada de citocinas proinflamatorias con regulación vía IRF 3, 5 y 8; incluyendo citocinas que participan en la vía Th17 (IL-6, IL-12/IL-23p40, e IL-17). La interrupción de la vía IL-23/Th17 en

los ratones Ro52^{-/-} por delección de IL-23/p19 mostró una protección completa de la dermatitis y de manifestaciones sistémicas de autoinmunidad.

Los datos de estos experimentos indican que Ro52/TRIM21 tiene un papel regulador en las respuestas de IFN. Su expresión puede sobre-expresarse en la familia de IFN tipo I y II para inhibir posteriormente varios IRF y sus citocinas (IL-12/IL-23p40, IL-6, y TNF alfa)

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR UBICUITINACIÓN A TRAVÉS DE TRIM21

La ubiquitinación es una modificación post-traduccionaI dinámica que regula y/o amplia el espectro funcional de un sustrato proteico en respuesta a señales específicas. La ubiquitina (76aa) fue el nombre designado inicialmente para referirse a la degradación dependiente de proteosoma de un sustrato proteico(34). Consiste en una reacción enzimática “en cascada” dependiente de ATP que involucra 3 clases de enzimas, denominadas E1 (enzima activadora de ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) y E3 (ligasa de ubiquitina); las cuales forman una unión isopeptídica estable entre el residuo de glicina C-terminal y el grupo amino épsilon del receptor de residuos de lisina de la proteína blanco.

La ubiquitina por sí misma contiene 7 residuos de lisina (K6, K11, K 27, K29, K33, K48 y K63), los cuales permiten su ramificación al conjugar más ubiquitinas. De esta manera, para un residuo de lisina determinado se puede aceptar un residuo (monoubiquitinación) o la cadena de residuos (poliubiquitinación). Esta diversidad conlleva a la presentación de distintos resultados funcionales de las proteínas modificadas.

La poliubiquitinación ligada a K-48 es reconocida por la subunidad 26S del proteosoma, por lo que se considera una señal de degradación proteica. La poliubiquitinación ligada a K-63 regula la activación de cinasas, tolerancia de daño al DNA, traducción de señales intracelulares y endocitosis.

Estudios recientes(35;36) han demostrado que Ro52 es una ligasa de ubiquitina E3 involucrada en la regulación de múltiples sustratos a través de la degradación por vía del proteosoma o la modulación de la función del sustrato; siendo el dominio RING de la familia TRIM el que tiene esta función de ligasa de ubiquitina.

Los estudios que analizan las vías de ubiquitinación TRIM han identificado que los miembros de la familia TRIM pueden inducir la ubiquitinación mediada por K63 o L48. A pesar que el primero facilita la interacción entre proteínas y es crítico para la regulación de la señalización celular, K48 permite la degradación de proteínas vía proteólisis por la vía del proteosoma. Se ha reportado que TRIM25 induce ubiquitinación de los dominios de caspasa N-termial de RIG-I vía K63, lo cual es esencial para disparar la respuesta IFN tipo I ante RNAdc (36,37).

TRIM56 induce la ubiquitinación de STING vía K63 lo cual permite que STING (adaptador central para los sensores de DNA) pueda iniciar la dimerización y reclutar TBK1 para iniciar la respuesta IFN- β a DNA intracelular (38).

En contraste, TRIM28 induce la ubiquitinación y degradación de TRAF6 vía K48 en respuesta a la estimulación de macrófagos con poly (I:C) y bloquea la activación del factor de transcripción NF- κ B y MAP cinasas, lo cual regula negativamente la producción de citocinas proinflamatorias. (30)

TRIM6 se identificó recientemente como otra proteína de la familia TRIM que juega un papel importante en la vía de la señalización de IFN y respuesta antiviral, junto a los sustratos E2Ub: Ube2K, sintetiza K48 poly-Ub que activa IKKe para fosforilar STAT1 resultado en la inducción de un subtipo de ISGs que son esenciales para la respuesta antiviral *in vitro* e *in vivo*.

ASOCIACIÓN DE TRIM21 EN AUTOINMUNIDAD

Se han observado distintas patologías autoinmunes asociadas a TRIM21(37), específicamente aquellas que presentan sobre-expresión de IFN tipo I tales como: síndrome de Sjogren (SS), Lupus eritematoso generalizado (LEG) y miopatías inflamatorias (MII).

Los anticuerpos anti-Ro se han utilizado como un marcador diagnóstico para LEG y SS; sin embargo, este auto-anticuerpo se encuentra presente en otras enfermedades autoinmunes tales como esclerosis sistémica (SSc), MII, enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) y artritis reumatoide (AR)(38;39).

A pesar de ser un marcador serológico utilizado por décadas, no ha sido sino en los últimos años que se ha estudiado la identidad molecular del autoantígeno Ro, el cual consiste de 2 proteínas: Ro52 (también denominado TRIM21, SSA1 ó RNF81) y Ro60 (denominado SSA2 o TROVE2), los cuales se caracterizan por diferencias significativas tanto en su estructura como función(21;24;40;41) .

Los anticuerpos anti-Ro se han reportado en asociación con fotosensibilidad, lupus cutáneo subagudo, vasculitis cutánea, trastornos hematológicos, enfermedad pulmonar intersticial y lupus neonatal (incluyendo bloqueo del sistema de conducción cardíaco congénito)(42-44). Se asocian con los haplotipos HLA-DR3 y/o DR2 y deficiencia del complemento C4(45).

Los anticuerpos contra TRIM21/Ro52 se han utilizado para el diagnóstico y monitorización de estas manifestaciones clínicas y se ha sugerido que pueden formar parte del esquema fisiopatogénico de las mismas(40;46).

El significado clínico de TRIM21/Ro52 permanece controversial debido a que existen algunas interacciones no inmunológicas entre la proteínas TRIM21 y la inmunoglobulina IgG(47). Uno de los mecanismos propuestos para esta asociación es que TRIM21 juega un papel relevante en favorecer la degradación por vía del proteosoma de IgG1 con alteraciones en el plegamiento, sugiriendo que se encuentra

involucrado en el control de calidad de las inmunoglobulinas(48). Otros estudios han reportado que el dominio CC es el blanco antigénico dirigido más común de TRIM21 tanto en LEG y MII. Para SS, el blanco antigénico está dirigido contra los dominios de RING, B-box y CC.(8;49)

A pesar de estos estudios, hasta ahora se conoce poco acerca de la relación entre la actividad de TRIM21 como receptor Fc y autoantígeno.

Dentro de los estudios de asociación de las enfermedades autoinmunes reportados, de los más relevantes se encuentra el publicado por Rutjes et al (50), donde reportaron que la presencia de anti-TRIM21/Ro52 se asociaba con mayor prevalencia para enfermedad pulmonar intersticial (77.1% vs 38.5% $p=0.009$) y tasa de mortalidad del 25%.

Asimismo Ghillani et al(38) analizaron la frecuencia de anti-TRIM21/Ro52 de manera aislada o con la expresión de otros auto-anticuerpos en 155 sueros, reportando la presencia aislada de anti-Ro52 en el 57% (n=89); en el 43% (n=43) presentaron anti-Ro52 + 1 autoanticuerpo detectado (Anticuerpos anti-nucleares por IFI). De las muestras de suero analizadas, n=30 pertenecían a pacientes con miositis o dermatomiositis (19.3%). Las manifestaciones pulmonares se asociaron frecuentemente con la presencia de anticuerpos anti-Ro52 (n=34, 22%) y anti-tRNA-sintetasas, anti-SRP o anti-Ku (18/34). Lo anterior sugiere que la presencia de anti-Ro52 puede preceder al desarrollo de enfermedades autoinmunes, lo que requeriría un seguimiento secuencial de pacientes positivos a este auto-anticuerpo, particularmente los que presentan progresión de la enfermedad pulmonar intersticial.

Por otra parte, Dugar (40) en el 2010 en un análisis realizado en 325 sueros de pacientes con enfermedades reumatológicas, reportó que la frecuencia de los antiRo52/Ro60 en miopatías inflamatorias (MII) es diferente en comparación a otras enfermedades del tejido conectivo (35,4 % vs 0 %). Estos resultados son compatibles con los reportes previos hechos por Schulte (39) que identificó la positividad de anti-

Ro52 en el 20 % de los pacientes con MII, siendo la presencia conjunta de anti-Jo1 en el 56% de los pacientes.

El estudio de la asociación clínica de anti-Jo1 y anti-Ro52 fue realizado en un estudio multicéntrico(51) con 89 pacientes con diagnóstico de MII (DM n=24; PM n=12) con seguimiento a 18 meses. El estudio reportó un mayor deterioro del estado funcional pulmonar 21.4% vs 10.5% p=0.302 y una menor supervivencia (p = 0.05) cuando se encontraron presentes ambos auto-anticuerpos.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRIM21 EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Los estudios que analizan la expresión proteica de TRIM21 y la presencia de anti-TRIM21 en enfermedades autoinmunes son escasos, los cuales se han reportado exclusivamente en LEG y SS.

Los principales trabajos han sido realizados en el Hospital Karolinska por el grupo de Espinosa et al, donde evaluó la expresión de TRIM en LEG y SS (52) en 18 pacientes con LEG y 20 con SS. Se determinó la presencia de anti-TRIM21 en 30-40% y demostró que la expresión de TRIM21 en pacientes con anticuerpos anti-TRIM21 era mayor en células CD19+, sin embargo este hallazgo no correlacionó con un aumento en la expresión proteica en estas células. Las principales vías de ubiquitinación identificadas fueron a través de Ubch2, Ubch5a-c, Ubch6, Ubch7.

En un segundo estudio, Espinosa evaluó 75 pacientes con LEG y SS; se les determinó la presencia de anti-TRIM21, los cuales se presentaron en el 79% de SS y 82% de LEG. Identificaron que los anticuerpos van dirigidos contra las uniones de Zn²⁺ en RING y esto inhibe las reacciones de ubiquitinación, bloquea los sitios de unión de E2-E3 a nivel de las asas 1 y 2 (L1-L2) de RING.(53)

El único estudio de expresión proteica a nivel tisular ha sido realizado en pacientes con SS. En este trabajo Agrawi et al(54) evaluaron la expresión en glándula salival y ductal asociada a inflamación en pacientes con SS primario (SSp), mediante la

generación de un anticuerpo anti-TRIM21 con especificidad para CC. Los pacientes con mayor infiltrado mononuclear exhibieron una mayor expresión de Ro52 en el epitelio ductal en comparación con el tejido de controles sanos ($p=0.03$).

De esta manera, el papel que juega TRIM21 en enfermedades autoinmunes; específicamente las asociadas con la firma de interferón, tales como LEG, SS y MII, parece estar relacionado directamente con la respuesta inflamatoria como se ha expuesto anteriormente en modelos animales, sangre periférica en pacientes en LEG y SS. Hasta el momento, los estudios realizados han mostrado que la deficiencia de TRIM21 (identificado como mayor título de anticuerpos anti Ro52/TRIM21) se asocia a una manifestación más grave de la enfermedad, especialmente en MII. Sin embargo, no se ha evaluado si existe una alteración en la expresión constitutiva de TRIM21, el subtipo celular asociado con esta alteración en la expresión, la vía de ubiquitinación utilizada ni el subtipo de citocinas que se genera en este ambiente; por lo que su identificación complementaría de manera significativa el entendimiento de los factores que promueven un ambiente más proinflamatorios en MII.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El papel de TRIM21/Ro52 como regulador intracelular de los procesos inflamatorios está bien documentado, donde una alteración en la funcionalidad o disminución en la expresión de TRIM21/Ro52 favorece la persistencia de la respuesta inflamatoria e inicia de la cascada de muerte celular, la transcripción de genes reguladores de interferón tipo I (RIG-I) y citocinas inflamatorias tales como IL-17.

Además, los estudios en sangre periférica en pacientes con LEG han mostrado que existe una menor expresión de TRIM21/Ro52 en macrófagos, linfocitos B y T así como células dendríticas asociados probablemente a una alteración en la función por anticuerpos inhibitorios (anti-TRIM21/Ro52); siendo la presencia de anti-TRIM21/Ro52 un marcador de mal pronóstico asociado a gravedad de la enfermedad.

Sin embargo, la determinación de anti-TRIM21/Ro52 es difícil, y sólo los anticuerpos dirigidos contra la porción de unión a Zn^{+2} del dominio RING parecen bloquear la función de este dominio como ligasa E3 de ubiquitina.

De esta manera, es indispensable el análisis de la expresión proteica de TRIM21/Ro52 en enfermedades autoinmunes donde la firma de interferón es altamente representativa, siendo de vital importancia en MII como potencial marcador pronóstico. El análisis de su expresión en CMNSP y la correlación con el perfil de citocinas en sangre periférica son esenciales para caracterizar el papel fisiopatogénico de esta proteína.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios epidemiológicos indican una alta prevalencia de anti-TRIM21/Ro52 en la enfermedad pulmonar intersticial asociada a MII (40.4%; Dugar M 2010); siendo la asociación Jo1/Ro52 de mal pronóstico funcional a nivel pulmonar con menores tasas de remisión y mayor mortalidad.

No obstante, hasta el momento los estudios que analizan la expresión de TRIM21 en este grupo de enfermedad se encuentran ausentes, por lo que es necesario conocer la expresión de TRIM21/Ro52 de acuerdo a los subtipos celulares, el patrón de citocinas y su asociación con auto-anticuerpos. Lo anterior permitiría comprender una pieza clave de la fisiopatología de la enfermedad, además de identificar y caracterizar a un marcador de riesgo en este subgrupo de enfermedades autoinmunes.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen alteraciones en la expresión de TRIM21 en diferentes subpoblaciones de CMN de sangre periférica de pacientes con MII?

4, OBJETIVOS

- Evaluar la **expresión de TRIM21** en células mononucleares (CMN) y subpoblaciones (linfocitos T y monocitos) de sangre periférica de pacientes con MII y controles sanos
- Evaluar **perfil de ubicuitinación global** en CMN de pacientes con MII y controles sanos
- Evaluar **respuesta efectora** (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α e IFN- γ) en sobrenadantes de cultivos

5. HIPÓTESIS

Hipótesis nula: Los pacientes con MII tendrán una expresión similar de TRIM21 en comparación con controles sanos.

Hipótesis alterna: Los pacientes con MII tendrán una deficiencia en la expresión de TRIM21 en comparación con controles sanos.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Criterios de inclusión:

Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes diagnosticados con MII de acuerdo a los criterios de Bohan y Peter (Dermatomiositis y Polimiositis) de 16 a 80 años de edad, en seguimiento en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán en el periodo comprendido de marzo del 2013 a abril del 2014. Los pacientes fueron evaluados en el departamento de Inmunología y Reumatología y no habían recibido tratamiento inmunosupresor un mes previo a la toma de la muestra.

Criterios de exclusión:

Se excluyeron mujeres embarazadas, pacientes trasplantados, pacientes con alguna otra enfermedad autoinmune, proceso infeccioso en el mes previo a la toma de muestra.

Se excluyeron los controles sanos con historia familiar de enfermedades autoinmunes.

Criterios de eliminación:

Muestra insuficiente para la caracterización de subpoblaciones en sangre periférica.

6. METODOLOGÍA

Material y métodos.

Aislamiento de CMN y subpoblaciones celulares: Posterior a la explicación amplia de la participación del paciente en el estudio, y a su respectiva firma del consentimiento informado, se procedió a la toma única de muestra de sangre venosa periférica (60 ml). A partir dicha muestra se obtuvieron células mononucleares mediante gradientes de densidad las cuales fueron aisladas mediante el método Ficoll-Hypaque. Posteriormente se aislaron y purificaron las subpoblaciones de células T CD4+ (selección negativa), linfocitos T CD8+ (selección positiva) y monocitos (CD14+, selección positiva) mediante selección con microesferas magnéticas, con una pureza mayor del 95%.

Análisis de la expresión de TRIM21/Ro52: Se obtuvieron lisados totales de CMN, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y monocitos. La expresión de TRIM21/Ro52 fue evaluada mediante Western Blot. Se realizó normalización con beta-actina y las imágenes fueron cuantificadas mediante densitometría con apoyo del programa Image Studio Lite versión 4.0.21 (LI-COR, Inc)

Análisis de la funcionalidad de TRIM21/Ro52 a través de la vía de ubiquitinación: Se obtuvieron lisados totales de las CMN y subpoblaciones ya mencionadas y se realizó WB para ubiquitina total y especies poliubiquitinadas (K48 y K63).

Cultivos celulares: Se aislaron CMN de sangre periférica mediante gradientes de densidad y posteriormente se aislaron linfocitos T CD4+ (selección negativa) y monocitos (CD14+, selección positiva) mediante selección con microesferas magnéticas de 4 pacientes con MII y 4 controles sanos, ajustados por edad y género. Los linfocitos T CD4+ y monocitos fueron sembrados en placas de 6 pozos con RPMI suplementado. Se trabajaron las siguientes condiciones experimentales: A) Reposo: RPMI y B) Estímulo: Los linfocitos T CD4+ fueron estimulados con anti-CD3 1 µg/mL y

los monocitos con LPS 1 µg/mL por 24 horas. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y fueron evaluados para la producción de citocinas.

Medición de citocinas: Se realizó la cuantificación de citocinas mediante el equipo de *Human cytokine* (Millipore). Se adicionó 25µL de amortiguador de ensayo (Millipore) en una placa de 96 pozos con fondo de filtro previamente bloqueada con 200µL de amortiguador de ensayo. Posteriormente se adicionó 25µL del sobrenadante de los cultivos celulares y 25µL de la mezcla de perlas para cada citocinas (IL-4, IL-8, IL-6, INF-γ, TNF-α) y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. A las 24 hrs, se realizaron dos lavados con 200µL por pozo de amortiguador de lavado (Millipore), la solución de lavado se removió por vacío y el remanente de la solución se eliminó mediante un papel absorbente. Después, se adicionó 25µL de anticuerpo de detección (Millipore) y se incubó durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se adicionó 25µL de estreptavidina-ficoeritrina (Millipore) y se incubó en oscuridad durante 30min a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron dos lavados con amortiguador de lavado y se adicionó 100µL de *Sheath Fluid* (Millipore), la placa se incubó por 5 min en agitación y se leyó en el equipo de *Lincoplex 200*, con el programa *Luminex 100 IS 2.3*. Se determinó la concentración de citocinas mediante la evaluación de las intensidades medias de fluorescencia en una curva de calibración, utilizando una medición de 5 parámetros de acuerdo a la siguiente formula:

$$y=a + b / (1 + (X /C) ^d) ^f.$$

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables numéricas se expresaron en términos de media y DE. Para las variables categóricas se utilizaron frecuencias y porcentajes. La comparación entre grupos se realizó mediante Kruskal-Wallis para medianas y prueba de X^2 para proporciones. Se consideró como significancia estadística una $p < 0.05$. El análisis se realizó mediante el programa estadístico SPSS para Mac versión 12.0

8. RESULTADOS

Se incluyeron 18 pacientes con MII (3 con polimiositis, 3 con síndrome antisintetasa y 12 con dermatomiositis) y 18 controles sanos. Las principales características demográficas, clínicas, de laboratorio, así como el tipo de auto-anticuerpos identificados se muestra en la Tabla 1. El 61% del grupo de estudio fue del sexo femenino, la MII predominante fue DM en el 66.6% con una mediana de edad de 46 (34-57) años. La exploración física inicial mostró un grado de fuerza muscular 3/5 (3-4) de acuerdo al MMT (Manual Muscle strenght Test). Los niveles de CPK al diagnóstico fueron de 804 (392-4695) UI/L con una cuenta de leucocitos de 5700 (5300-8350) y linfocitos de 1021 (683-1526) cells/ μ L; con cifras de ALT de 89 (47-139) y AST 93 (56-124).

Se evaluó la presencia de anticuerpos específicos de miositis (MSA) y anticuerpos asociados a miositis (MAA) mediante ELISA. Los autoanticuerpos en el grupo de DM fueron anti-Ro52 (25%), anti-PL7 (16.6%), anti-Ku (16.6%), anti-PL12 (8.3%), anti-SRP (8.6.6%) y anti-Mi2 (10%). En el grupo de antisintetasa, los anticuerpos identificados fueron anti-Ro52 (33.3%), anti-Jo1 (33.3%), anti-Ku (33.3%), anti-Mi2 (33.3%) y anti-PM-SCL75 (33.3%). En el grupo de PM se cocumentó anti-Ro52 (33.3%) y anti-Ku (33.3%).

En cuanto a los resultados correspondientes a la expresión de TRIM21/Ro52 , los pacientes con MII mostraron una disminución en la expresión proteica de manera significativa al compararlo con controles sanos (Tabla 2). El análisis por subpoblaciones celulares mostró que la expresión de TRIM21/Ro52 en CMNSP de pacientes con MII fue de 0.9713 ± 0.6037 vs 1.8493 ± 0.9274 en controles con $p=0.016$. La gráfica 1 muestra los datos acumulados de la expresión de TRIM21/Ro52 en CMNSP y la figura 1 muestra el WB representativo del análisis.

La expresión de TRIM21/Ro52 en linfocitos T CD4⁺ de los pacientes con MII fue de 0.7973 ± 0.5404 en comparación con controles, que presentaron cifras de 2.4134 ± 0.7868 con $p=0.017$. (Véase gráfica y figura 2)

La subpoblación de monocitos también mostró una menor expresión de TRIM21/Ro52 en MII 0.8751 ± 0.3586 vs 1.8908 ± 0.2092 en controles, con $p < 0.001$. (Véase gráfica y figura 3).

Los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con MII mostraron una menor expresión de TRIM21/Ro52: 0.9025 ± 0.7081 vs 1.6102 ± 0.5404 en controles, $p = 0.133$. (Véase gráfica y figura 4) No identificamos diferencias significativas en la expresión proteica de TRIM21/Ro52 entre los grupos de MII.

Perfil de ubiquitinación en CMN y subpoblaciones celulares en pacientes con MII

Evaluación del perfil de ubiquitinación

Se documentó una disminución en el perfil global de ubiquitinación en CMN, monocitos y linfocitos T CD4⁺ de pacientes con MII en comparación con los controles. Así mismo, encontramos disminución en poliubiquitinación mediada por K48, de predominio en monocitos y linfocitos T CD4⁺ de pacientes con MII. Esta disminución en las proteínas poliubiquitinadas es exclusiva de aquellas que son marcadas en K48, puesto que no encontramos dichas diferencias en poliubiquitinación mediada por K63.

Perfil de citocinas en subpoblaciones celulares en pacientes con MII

Se analizaron en los sobrenadantes de cultivos sometidos al estímulo (anti-CD3 o LPS) y en reposo las siguientes citocinas: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α e IFN- γ , mediante la técnica descrita previamente (Tabla 5).

Se encontró incremento en la producción de IL-6 por los linfocitos T CD4⁺ posterior a su activación con anti-CD3 en las muestras de los pacientes con MII vs controles sanos (6300.9 ± 562 vs 2942 ± 782 , $p = 0.011$). Así mismo, encontramos menor producción de IFN-gamma en los linfocitos T CD4⁺ posterior al estímulo en las muestras de pacientes con MII en comparación con controles sanos (615.6 ± 113.4 vs 7412.6 ± 3659 , $p = 0.039$). En los cultivos de los monocitos, ya sea en reposo o post-activación no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Tampoco encontramos diferencias en las concentraciones basales de los linfocitos T en reposo.

9. DISCUSIÓN

Las MII son un grupo de enfermedades autoinmunes que tienen en común la presencia de un proceso inflamatorio con destrucción del músculo esquelético. En el presente trabajo, la MII más frecuente fue DM con 12 pacientes sin diferencia en el número de pacientes entre el grupo de síndrome antisintetasa y poliomiositis. Lo anterior es de relevancia para el estudio, dado que TRIM21/Ro52 se presenta con mayor frecuencia en DM y ha sido identificado en los estudios epidemiológicos de Marie et al [51] como un factor de mal pronóstico a 10 años, con una supervivencia acumulada a 108 meses de 0.7 y una RM de 4.46 [IC95% 1.02-19.47; p=0.04] para desarrollo de cáncer; con una alta prevalencia de la co-expresión de TRIM21/Ro52 en pacientes anti-Jo1 positivos (40.1%).(55)

No es posible la comparación de la expresión conjunta de estos dos autoanticuerpos en este estudio por el menor número de pacientes, sin embargo llama la atención que sólo 1 paciente con anti-Jo1 presentó anti-Ro52. Probablemente la diferencia geográfica y las características de la población hacen que esta expresión sea menos frecuente, sin embargo son necesarios estudios de cohorte con una mayor población para confirmar este hallazgo.

Por otro lado, el papel de TRIM21/Ro52 es esencial para limitar las respuestas inflamatorias inducidas vía TLR, como Espinosa et al demostraron en su modelo murino *Trim-null*, donde la alteración en la expresión funcional de TRIM21/Ro52 promovía un aumento en los niveles circulantes de IFN-I e IL23 con una respuesta incrementada a los ligandos TLR7 y TLR9. Si bien, TRIM21/Ro52 se encuentra altamente conservado entre las especies con una homología del 67% entre las formas murinas y humanas, el papel fisiopatogénico de la expresión alterada de esta proteína no ha sido completamente estudiada en enfermedades autoinmunes; específicamente, no existen estudios que evalúan el comportamiento de esta ligasa E3 de ubicuitina en MII en modelos murinos ni *in vitro*.

Hasta el momento, los cultivos celulares en CMNSP que han evaluado la asociación entre la detección de anti-Ro52/TRIM21 y sus niveles de expresión proteica han sido realizados en pacientes con LEG y SS. En este trabajo sólo se identificaron 3 pacientes con anti-Ro52/TRIM21 determinado por ELISA en el grupo de DM y síndrome antisintetasa pero todas las subpoblaciones celulares evaluadas de los pacientes con MII mostraron una menor expresión de Ro52/TRIM21, especialmente en CD4⁺ y CD14⁺,

Estos resultados muestran que la expresión proteica no está ligada directamente a la expresión de autoanticuerpos y que es posible que existan otros mecanismos que inhiban la expresión o aumenten la degradación de Ro52/TRIM21.

Los estudios que han analizado las vías de ubiquitinación en Ro52/TRIM21 han sido realizados principalmente bajo un contexto de la neutralización dependiente de anticuerpos estimulados por patógenos (ADIN). En este contexto, TRIM21 cataliza la formación de cadenas libres de ubiquitina K63 vía enzimas conjugadoras E2 Ubc13 y UEV1A de una manera dependiente de RING a través de 3 vías inmunológicas: NFKb, AP-1 y Familia IRF (IRF3, IRF5 e IRF7)(56).

Sin embargo, al evaluar la respuesta de TRIM21 en autoinmunidad considerándolo como un sensor de daño intracelular a DNAdc (Ej DDX41 en células dendríticas meloides y monocitos(57)) se ha documentado la inducción de degradación de DDX41 por ubiquitinación vía K48 de DDX41 pero no de K63.

Teniendo en cuenta que tanto la fosforilación de TRIM21 como la vía de ubiquitinación de esta E3 ligasa (K48 o K63) son determinantes para su función y actividad como un regulador negativo de la producción de citocinas mediadas por IRF3 e IRF5, se realizó una evaluación del perfil de ubiquitinación en CMN y subpoblaciones celulares de los pacientes con MII.

En cuanto a las vías de ubiquitinación analizadas en TRIM21/Ro52, los resultados de este estudio sugieren que la disminución en la poliubiquitinación observada en monocitos y linfocitos T CD4⁺ depende de especies poliubiquitinadas asociadas a K48,

la cual está asociada a menor degradación de sustratos a través de la vía del proteosoma. Esta deficiencia en la poliubiquitinación puede estar asociada a la deficiencia de TRIM21/Ro52 en pacientes con MII.

Estos resultados coinciden con los reportados por el estudio de Zang et al.(57), siendo los sustratos identificados para K63, Ubc13 y UEV1A a través de TAK1 para estimular la producción del factor de transcripción NFκB especialmente en el contexto de ADIN. Sin embargo, en el contexto de autoinmunidad asociado a TRIM21/Ro52, la vía de ubiquitinación identificada es K48 que coincide con lo reportado en este trabajo; probablemente las proteínas E2 asociadas sean UbcH2, UbcH5a-c, UbcH6, UbcH7(52), las cuales se asocian a mayor degradación de proteínas (incluyendo DDX41) con sustratos finales en modulación de la transcripción en IRF (3,5,7) y AP1 (c-Jun, FosB).

En cuanto al papel que juegan las citocinas como mediadores en inflamatorios en MII, el estudio de Lundberg et. al.(58) mostró que existe un incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias a nivel muscular, particularmente IL-1 α , IL-1b, TNF- α y MIP-1 así como las citocinas inhibitorias TGF- β sin diferencia entre el patrón de citocinas y quimiocinas entre PM ni DM; siendo relevante el hallazgo de la alta expresión de IL1 α documentada en células endoteliales de pacientes con enfermedad activa y crónica.

Hasta el momento existen diversos trabajos que han analizado la expresión de citocinas en tejido muscular mediante inmunohistoquímica (59;60) siendo IL-1 α la citocina que se expresa de manera persistente en MII, con alta expresión en el endotelio de los capilares, arteriolas y vénulas, tanto en endomisió como en perimisió y en células mononucleares. IL β se observó en 10/15 pacientes pero, a diferencia de IL1a, no estuvo expresada en las paredes de los vasos sanguíneos. El resto de patrón de citocinas no presentaron un patrón específico entre MII. De esta manera se puede concluir que la expresión de citocinas en tejido muscular en pacientes con MII es dominado por IL1a, IL1b, TGF β (1-3)

A nivel de citocinas en suero, el papel del IFN tipo I es evidente como una citocina que puede ser de utilidad como un indicador diagnóstico y pronóstico. El estudio de Capelleti et al(61) mostró una elevación de la expresión de RNAm de IFN tipo I en CMNSP de pacientes con MII, especialmente en DM. Recientemente se publicó un estudio donde se analiza el perfil de citocinas en 124 pacientes con diagnóstico de MII y su asociación con enfermedad pulmonar intersticial (EPI)(62) presentando una frecuencia de anticuerpos anti-sintetasa en un 32% con una mayor concentración sérica de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- α , IFN- γ e IP-10 en comparación con los controles; mientras que no hubo diferencia para IL-12, IL-13 e IL-17 en el grupo de MII ni controles. Hubo correlación entre los niveles de IL-1 β e IL-6 ($r_s=0.55$ $p<0.01$) y de IL6/TNF α ($r_s= 0.72$ $p<0.01$). En el análisis multivariado de citocinas en el grupo EPI vs no-EPI, sólo TNF- α se asoció significativamente con PM/DM/CADM en EPI (RM 1.4 IC95% 1.1-2.2; $p= 0.0006$). Este estudio reportó que IL-6, IL-8, TNF- α e IP-10 están asociados con actividad global de la enfermedad en MII y se encuentran en mayor concentración en el subgrupo de EPI.

En este trabajo, las citocinas identificadas fueron principalmente IFN γ e IL-6 en linfocitos T CD4⁺. Las células en reposo de MII tuvieron mayor expresión de IL-6 en comparación con los controles ($p<0.05$). También se observó una menor respuesta ante el estímulo con anti-CD3 en MII vs control de acuerdo a las concentraciones de IFN γ .

10. CONCLUSIONES

Hasta el momento es el primer trabajo que analiza el tipo de expresión y las vías de ubiquitinación asociadas en subpoblaciones celulares de pacientes con MII. Los resultados de este estudio muestran que efectivamente existe de manera basal una disminución significativa en la expresión proteica de TRIM21/Ro52 de los pacientes MII de las principales células inflamatorias en CMNSP, linfocitos T CD4 y monocitos; presentando una disminución en linfocitos TCD8 con una tendencia estadísticamente significativa, lo cual puede explicarse por ser un número de muestra pequeño.

En cuanto al perfil de citocinas y patrón de autoanticuerpos es necesario ampliar el número de pacientes en el estudio, con subgrupos de MII más homogéneos, para que los hallazgos identifiquen de manera representativa cuál es la expresión de la MII en nuestra población. Si bien la prevalencia del síndrome antisintetasa en baja en la población Mexicana, es importante identificar si además de la baja expresión de TRIM21/Ro52 identificada en las MII la expresión de anticuerpos anti-TRIM21/Ro52 y anti-Jo-1se asocia con alguna otra deficiencia en la regulación de la tolerancia periférica y un perfil de citocinas pro-inflamatorio.

Además, es necesario una mejor comprensión de la función de la ligasa E3 de ubiquitina TRIM21/Ro52, ya que su mejor entendimiento puede tener implicaciones en la fisiopatogenia de la enfermedad, específicamente aquellas relacionadas con la firma de interferón y relacionada como un probable factor pronóstico en MII. Hasta el momento se ha identificado que la deficiencia en TRIM21 puede estar relacionada con una disminución de la ubiquitinación (K48) y degradación de los factores reguladores de interferón (IRF), lo cual aumenta la señalización del interferón tipo I.

Tabla 1: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y SEROLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD SEGÚN TIPO DE MII

VARIABLE	Dermatomiositis n= 12 (66.6%)	Antisintetasa n=3 (16.6%)	Polimiositis n=3 (16.6%)
Edad – años*	46 (34-57)	47 (41-49)	56 (54-79)
Sexo femenino –n(%)	7 (58.3%)	3 (100%)	1 (33.3%)
Fuerza muscular (0-5) *	3 (3-4)	4 (2-5)	3 (3-4)
AST U/L*	93 (56-124)	40 (24-76)	29 (17-69)
ALT U/L*	89 (47- 139)	33 (21-96)	55 (21-59)
Niveles de CPK U/L*	804 (392-4695)	2467 (160-3804)	1058 (93-2801)
Leucocitos cels/μL*	5700 (5300-8350)	8900 (7000-9100)	8300 (5600-12200)
Linfocitos cels/μL*	1025 (683– 1526)	700 (637 – 2778)	2407 (464-4270)
MSA y MAA			
-Anti-Ro52–n (%)	3 (25%)	1 (33.3%)	1(33.3%)
-Anti-Jo1–n(%)	0	1 (33.3%)	0
-Anti-OJ–n(%)	0	0	0
-anti EJ–n(%)	0	0	0
-Anti-PL7–n(%)	2(16.6%)	0	0
-Anti-Ku–n(%)	2(16.6%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)
-Anti-PL12–n(%)	1(8.3%)	0	0
-Anti-SRP–n(%)	1(8.3%)	0	0
-Anti-Mi2–n(%)	2(16.6%)	1 (33.3%)	0
-Anti-PM/SCL75–n(%)	0	1 (33.3%)	0
-Anti-PM/SCL100–n(%)	0	0	0

* Mediana (rango intercuartilar)

CPK: Creatinfosfoquinasa sérica total ALT: Alanina aminotransferasa AST: Aspartato aminotransferasa

MSA: Anticuerpos específicos de miositis. MAA: Anticuerpos asociados a miositis

Tabla 2: NIVELES DE EXPRESIÓN PROTÉICA DE TRIM21/Ro52 POR SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS TCD4+

TIPO DE SUBPOBLACIÓN	MII n= 14 (50%)	CONTROL n=14 (50%)	P
CELULAR			
CMN	0.9713±0.6037	1.8493±0.9274	0.016
CD4+	0.7973±0.5404	2.4134±0.7868	0.017
CD8+	0.9025±0.7081	1.6102±0.5404	0.133
CD14+	0.8751±0.3586	1.8908±0.2092	0.001

Todas las variables numéricas se expresan en medianas (RIQ) a menos que se especifique lo contrario.

Las diferencias entre grupos fueron evaluados mediante T de Student. Se consideró como significativa p<0.05

Tabla 3: NIVELES DE CITOCINAS EN CULTIVOS CELULARES DE MII Y CONTROLES

VARIABLE *	T	T	Monocitos reposo	
	n= 4	est mulo n= 4	n= 4	n= 4
IL1β MII	622 \pm 340.08	463.89 \pm 220.36	904.84 \pm 452.49	820.60 \pm 269.29
IL1β control	245 \pm 175.5	253.58 \pm 173.77	11.76 \pm 8.5	839.36 \pm 484.25
TNFα MII	1432.12 \pm 836.6	2018.16 \pm 613.23	2570.14 \pm 1249.04	1787.42 \pm 702.66
TNFα control	1703.93 \pm 1554	2029.71 \pm 1069.35	137.06 \pm 124.54	2991.25 \pm 380.13
IFNγ MII	295.15 \pm 265	615.64 \pm 65.76	3.28 \pm 0.8	3.17 \pm 0.02
IFNγ control	208.41 \pm 187.7	7412.64 \pm 2587.35	19.35 \pm 6.48	35.09 \pm 24.04
IL6 MII	4391.76 \pm 2586.81	6300.96 \pm 324.5	6306.83 \pm 2772.06	8441.26 \pm 900.51
IL6 control	3396.02 \pm 1418.71	2941216 \pm 553.12	1241.78 \pm 1198.72	10000 \pm 0
IL17 MII	0.40 \pm 0.08	95.23 \pm 54.94	0.40 \pm 0.24	0.40 \pm 0.27
IL17 control	2.29 \pm 0.73	16.6 \pm 15.58	0.14 \pm 0.09	0
IL4 MII	3.41 \pm 0.21	91.42 \pm 21.57	3.2 \pm 0.005	10.40 \pm 7.19
IL4 control	64.35 \pm 60.71	69.72 \pm 49.93	3.20 \pm 0.001	3.20 \pm 0.001

* Media \pm error estándar.

Gráfica 1: Expresión de TRIM21 en CMN

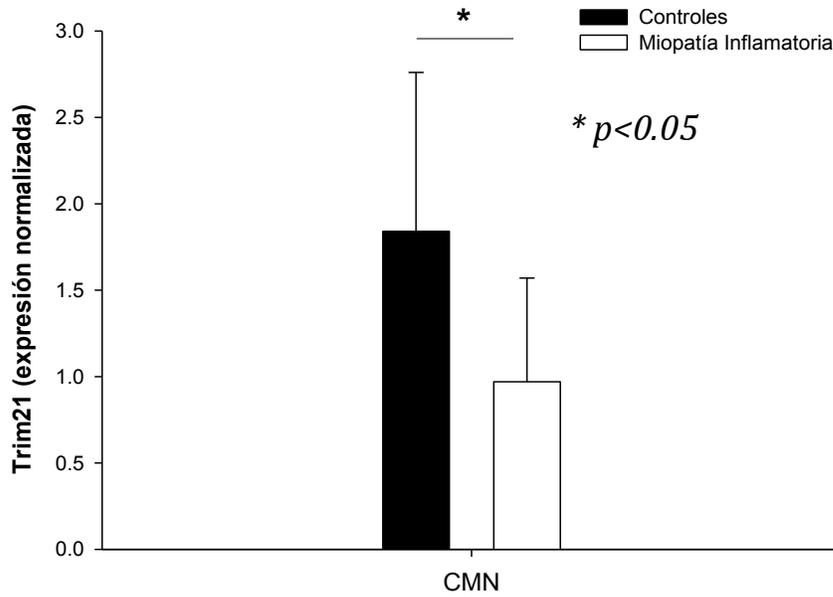
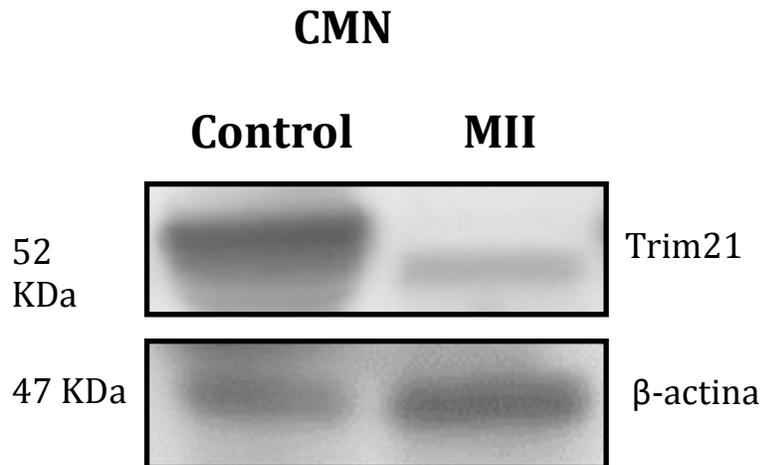


FIGURA 1: WESTERN BLOT DE TRIM21/RO52 EN CMN



Gráfica 2: Expresión de TRIM21 en linfocitos T CD4⁺

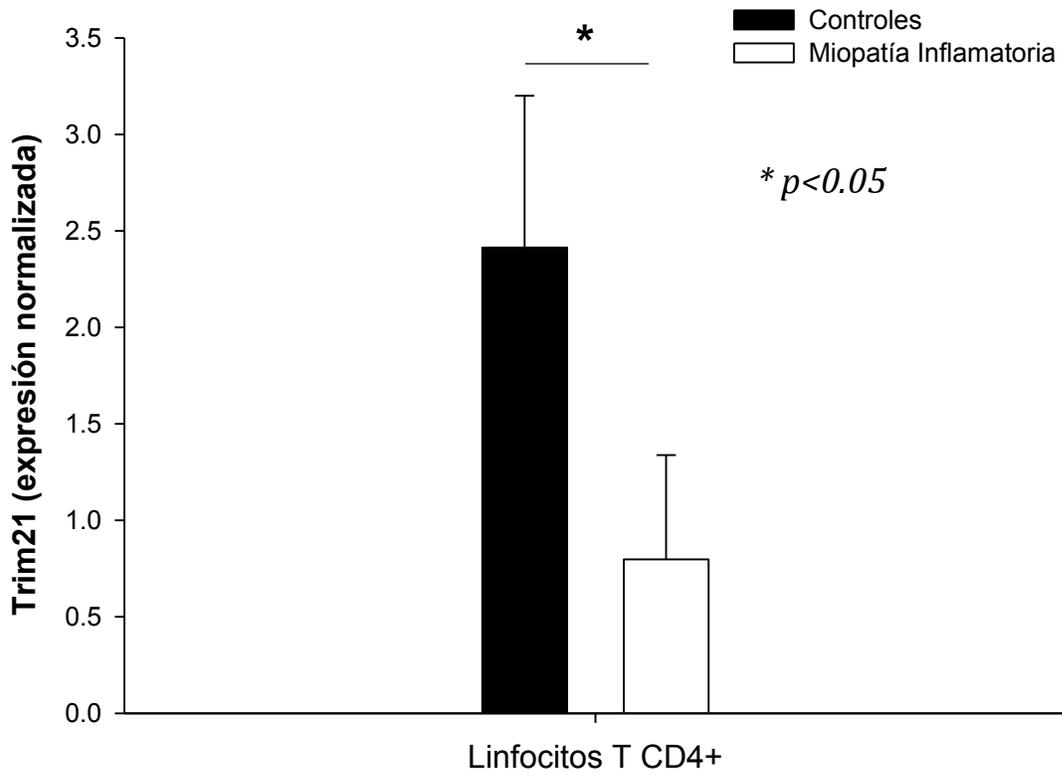
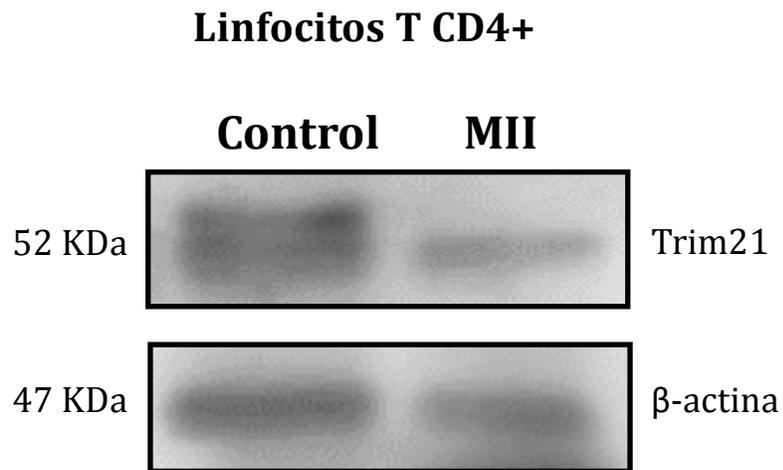


Figura 2: Western Blot de TRIM21/R052 en linfocitos T CD4⁺



Gráfica 3: Expresión de TRIM21 en linfocitos T CD8⁺

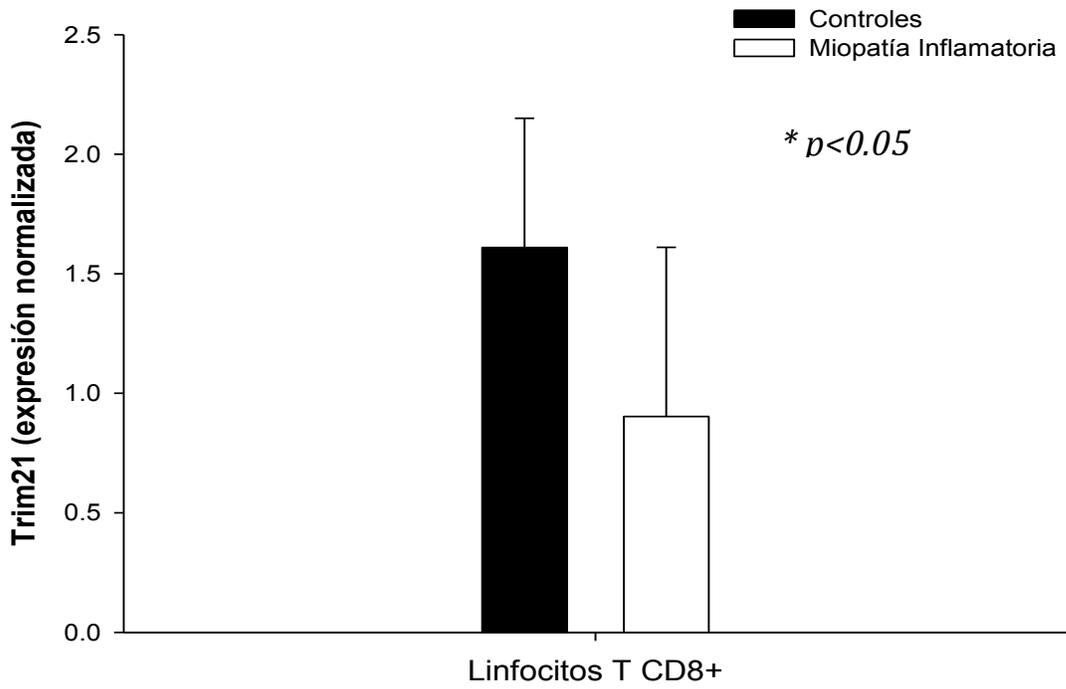
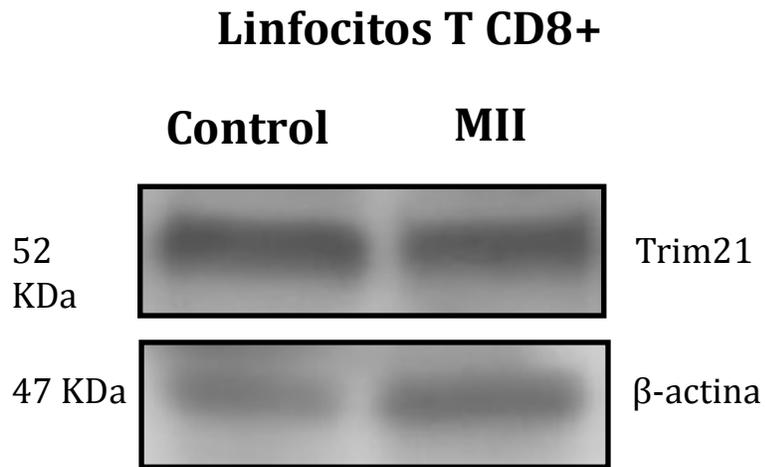


Figura 3: Western Blot de TRIM21/R052 en linfocitos T CD8⁺



Gráfica 4: Expresión de TRIM21 en monocitos

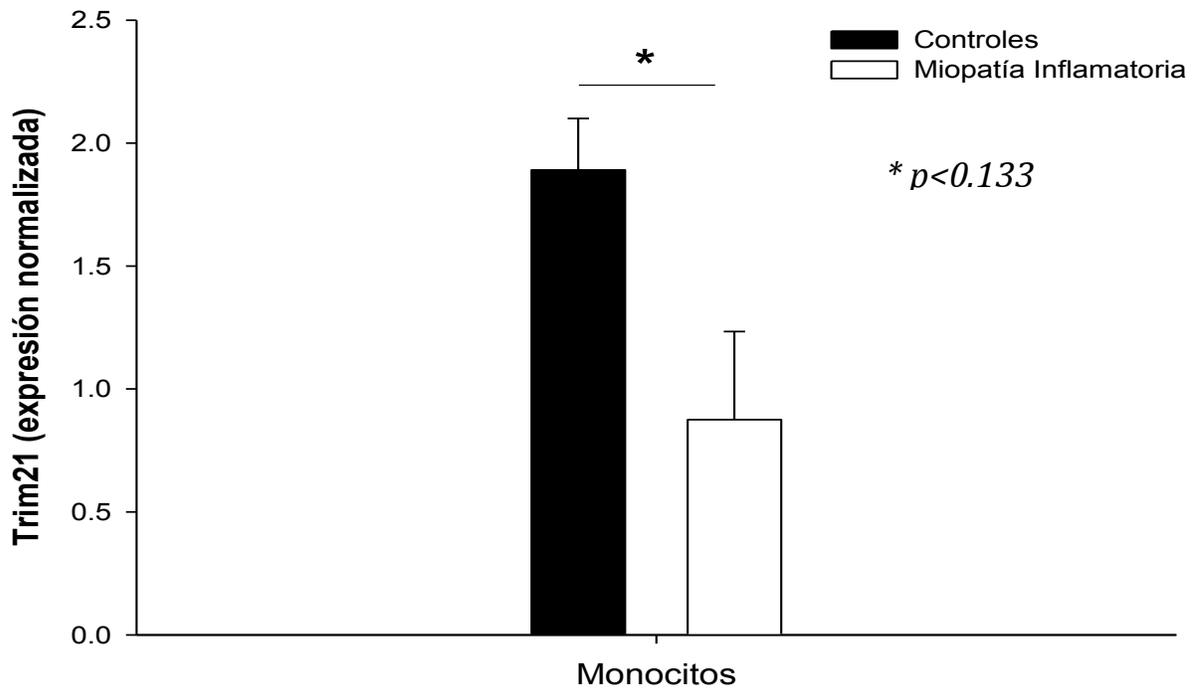
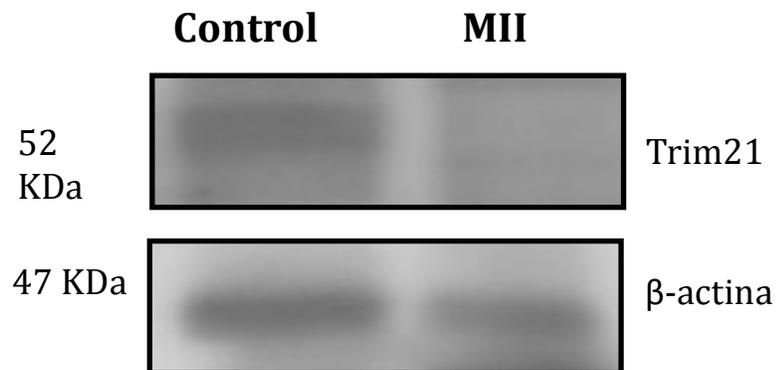
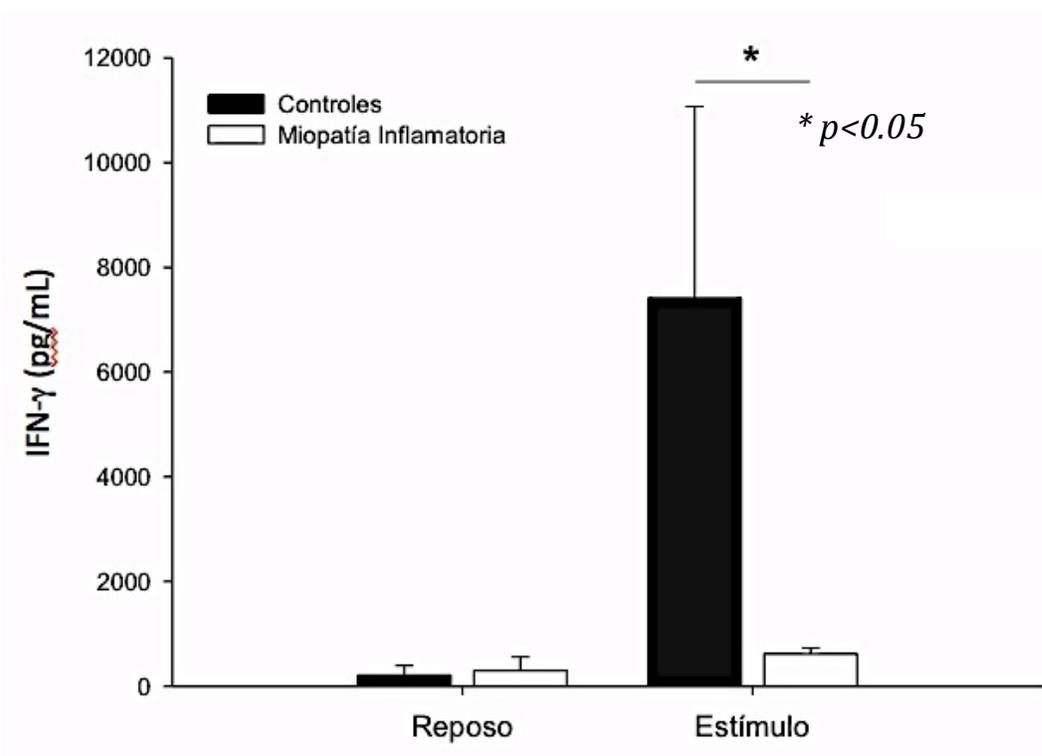


Figura 4: Western Blot de TRIM21/Ro52 en monocitos

Monocitos



Gráfica 5: Niveles de IFN γ en células T efectoras en MII y controles



Gráfica 6: Niveles de IL-6 en células T efectoras en MII y controles

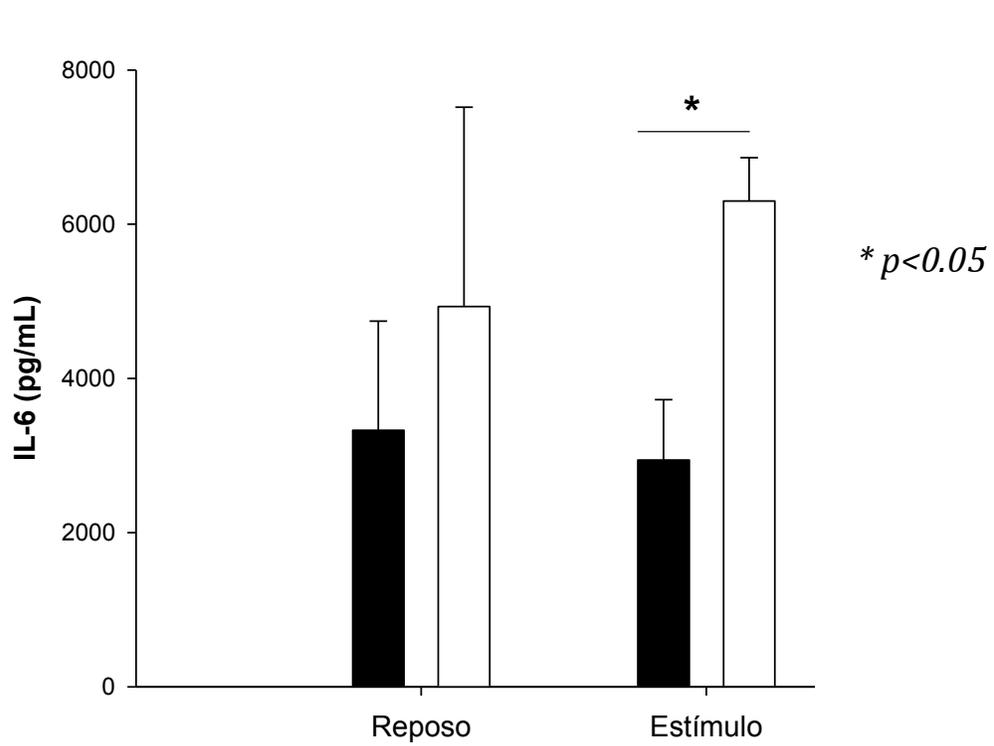


Figura 5: PERFIL DE UBICUITINACIÓN GLOBAL

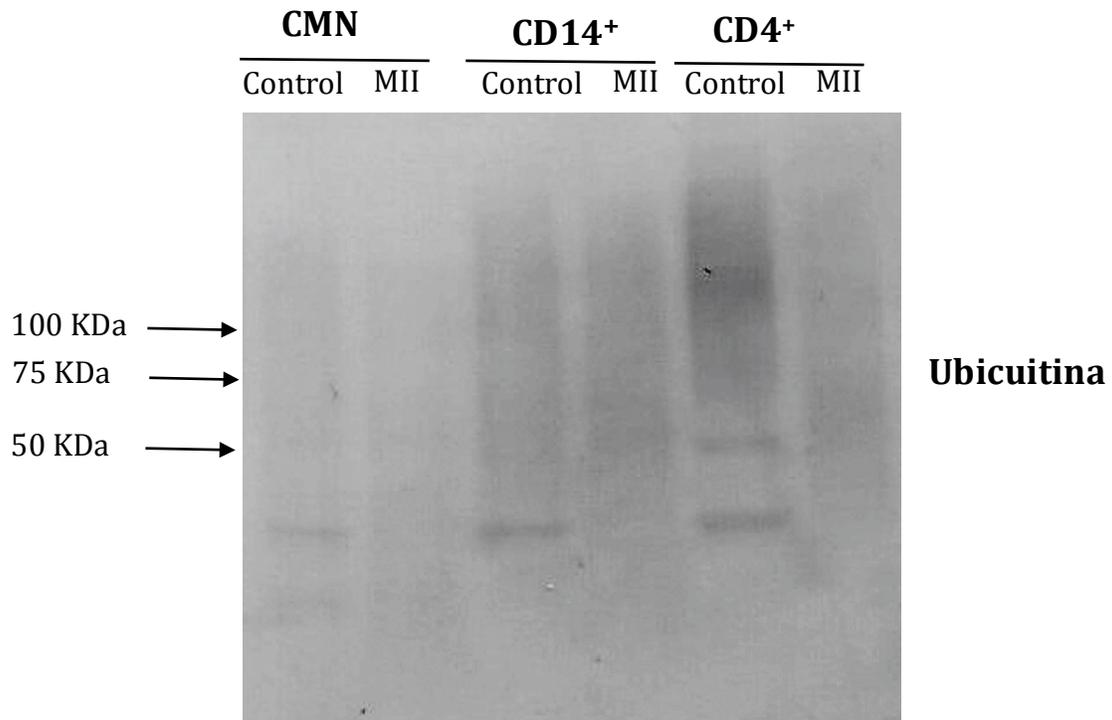
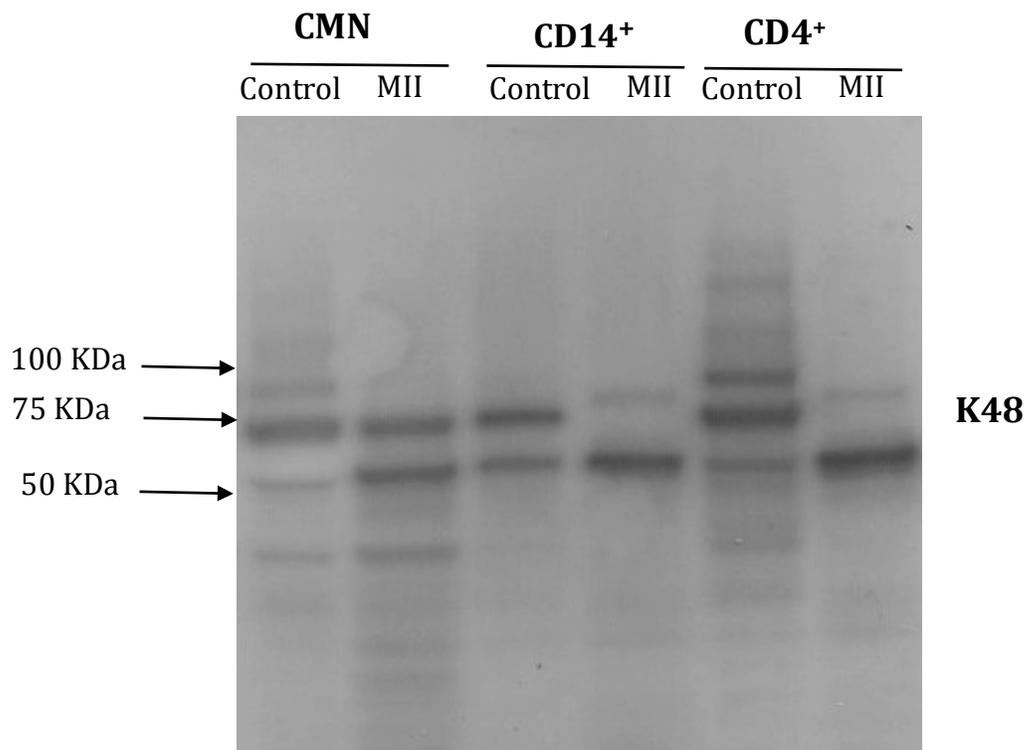


Figura 6: PERFIL DE UBICUITINACIÓN VÍA K48



REFERENCIAS

- (1) Wada K, Kamitani T. Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339(1):415-21.
- (2) Hennig J, Ottosson L, Andresen C, Horvath L, Kuchroo VK, Broo K et al. Structural organization and Zn²⁺-dependent subdomain interactions involving autoantigenic epitopes in the Ring-B-box-coiled-coil (RBCC) region of Ro52. *J Biol Chem* 2005; 280(39):33250-61.
- (3) Hennig J, Bresell A, Sandberg M, Hennig KD, Wahren-Herlenius M, Persson B et al. The fellowship of the RING: the RING-B-box linker region interacts with the RING in TRIM21/Ro52, contains a native autoantigenic epitope in Sjogren syndrome, and is an integral and conserved region in TRIM proteins. *J Mol Biol* 2008; 377(2):431-49.
- (4) Freemont PS. RING for destruction? *Curr Biol* 2000; 10(2):R84-R87.
- (5) Rajsbaum R, Garcia-Sastre A, Versteeg GA. TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. *J Mol Biol* 2014; 426(6):1265-84.
- (6) Kawai T, Akira S. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol Med* 2011; 3(9):513-27.
- (7) Kong HJ, Anderson DE, Lee CH, Jang MK, Tamura T, Taylor P et al. Cutting edge: autoantigen Ro52 is an interferon inducible E3 ligase that ubiquitinates IRF-8 and enhances cytokine expression in macrophages. *J Immunol* 2007; 179(1):26-30.
- (8) Oke V, Wahren-Herlenius M. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun* 2012; 39(1-2):77-82.
- (9) Zhang Z, Bao M, Lu N, Weng L, Yuan B, Liu YJ. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 negatively regulates the innate immune response to intracellular double-stranded DNA. *Nat Immunol* 2013; 14(2):172-8.
- (10) Sjostrand M, Ambrosi A, Brauner S, Sullivan J, Malin S, Kuchroo VK et al. Expression of the immune regulator tripartite-motif 21 is controlled by IFN regulatory factors. *J Immunol* 2013; 191(7):3753-63.
- (11) Ikeda K, Inoue S. TRIM proteins as RING finger E3 ubiquitin ligases. *Adv Exp Med Biol* 2012; 770:27-37.

- (12) Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem* 2006; 281(13):8970-80.
- (13) McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr Opin Immunol* 2011; 23(1):46-56.
- (14) Ozato K, Shin DM, Chang TH, Morse HC, III. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(11):849-60.
- (15) Chan EK, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 1991; 87(1):68-76.
- (16) Itoh K, Itoh Y, Frank MB. Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *J Clin Invest* 1991; 87(1):177-86.
- (17) Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 2001; 20(9):2140-51.
- (18) James LC, Keeble AH, Khan Z, Rhodes DA, Trowsdale J. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(15):6200-5.
- (19) Keeble AH, Khan Z, Forster A, James LC. TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(16):6045-50.
- (20) Keeble AH, Khan Z, Forster A, James LC. TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(16):6045-50.
- (21) Espinosa A, Oke V, Elfving A, Nyberg F, Covacu R, Wahren-Herlenius M. The autoantigen Ro52 is an E3 ligase resident in the cytoplasm but enters the nucleus upon cellular exposure to nitric oxide. *Exp Cell Res* 2008; 314(20):3605-13.
- (22) Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by disregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med* 2009; 206(8):1661-71.
- (23) Yoshimi R, Ishigatsubo Y, Ozato K. Autoantigen TRIM21/Ro52 as a Possible Target for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Rheumatol* 2012; 2012:718237.

- (24) Yoshimi R, Ishigatsubo Y, Ozato K. Autoantigen TRIM21/Ro52 as a Possible Target for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Rheumatol* 2012; 2012:718237.
- (25) Wada K, Kamitani T. Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339(1):415-21.
- (26) Watkinson RE, McEwan WA, James LC. Intracellular Antibody Immunity. *J Clin Immunol* 2014.
- (27) Wada K, Niida M, Tanaka M, Kamitani T. Ro52-mediated monoubiquitination of IKK β down-regulates NF- κ B signalling. *J Biochem* 2009; 146(6):821-32.
- (28) Higgs R, Ni GJ, Ben LN, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA. The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN- β production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol* 2008; 181(3):1780-6.
- (29) Yang K, Shi HX, Liu XY, Shan YF, Wei B, Chen S et al. TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *J Immunol* 2009; 182(6):3782-92.
- (30) Higgs R, Lazzari E, Wynne C, Ni GJ, Espinosa A, Wahren-Herlenius M et al. Self protection from anti-viral responses--Ro52 promotes degradation of the transcription factor IRF7 downstream of the viral Toll-Like receptors. *PLoS One* 2010; 5(7):e11776.
- (31) Kong HJ, Anderson DE, Lee CH, Jang MK, Tamura T, Taylor P et al. Cutting edge: autoantigen Ro52 is an interferon inducible E3 ligase that ubiquitinates IRF-8 and enhances cytokine expression in macrophages. *J Immunol* 2007; 179(1):26-30.
- (32) Kim JY, Ozato K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF- κ B activity. *J Immunol* 2009; 182(4):2131-40.
- (33) Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med* 2009; 206(8):1661-71.
- (34) Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 1996; 30:405-39.

- (35) Espinosa A, Zhou W, Ek M, Hedlund M, Brauner S, Popovic K et al. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol* 2006; 176(10):6277-85.
- (36) Wada K, Niida M, Tanaka M, Kamitani T. Ro52-mediated monoubiquitination of IKK β down-regulates NF- κ B signalling. *J Biochem* 2009; 146(6):821-32.
- (37) Oke V, Wahren-Herlenius M. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun* 2012; 39(1-2):77-82.
- (38) Ghillani P, Andre C, Toly C, Rouquette AM, Bengoufa D, Nicaise P et al. Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60kDa antibodies: results of a multicentric study. *Autoimmun Rev* 2011; 10(9):509-13.
- (39) Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. *Autoimmun Rev* 2009; 8(7):632-7.
- (40) Dugar M, Cox S, Limaye V, Gordon TP, Roberts-Thomson PJ. Diagnostic utility of anti-Ro52 detection in systemic autoimmunity. *Postgrad Med J* 2010; 86(1012):79-82.
- (41) Espinosa A, Hennig J, Ambrosi A, Anandapadmanaban M, Abenius MS, Sheng Y et al. Anti-Ro52 autoantibodies from patients with Sjogren's syndrome inhibit the Ro52 E3 ligase activity by blocking the E3/E2 interface. *J Biol Chem* 2011; 286(42):36478-91.
- (42) Oke V, Wahren-Herlenius M. Cutaneous lupus erythematosus: clinical aspects and molecular pathogenesis. *J Intern Med* 2013; 273(6):544-54.
- (43) Peene I, Meheus L, De KS, Humbel R, Veys EM, De KF. Anti-Ro52 reactivity is an independent and additional serum marker in connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(10):929-33.
- (44) Retamozo S, Akasbi M, Brito-Zeron P, Bosch X, Bove A, Perez-de-Lis M et al. Anti-Ro52 antibody testing influences the classification and clinical characterisation of primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30(5):686-92.
- (45) Burbelo PD, Ching KH, Han BL, Bush ER, Reeves WH, Iadarola MJ. Extraordinary antigenicity of the human Ro52 autoantigen. *Am J Transl Res* 2010; 2(2):145-55.
- (46) Kvarnstrom M, Dzikaite-Ottosson V, Ottosson L, Gustafsson JT, Gunnarsson I, Svenungsson E et al. Autoantibodies to the functionally active RING-domain of

Ro52/SSA are associated with disease activity in patients with lupus. *Lupus* 2013; 22(5):477-85.

- (47) Yang Y, Eversole T, Lee DJ, Sontheimer RD, Capra JD. Protein-protein interactions between native Ro52 and immunoglobulin G heavy chain. *Scand J Immunol* 1999; 49(6):620-8.
- (48) Takahata M, Bohgaki M, Tsukiyama T, Kondo T, Asaka M, Hatakeyama S. Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system. *Mol Immunol* 2008; 45(7):2045-54.
- (49) Frank MB, McCubbin V, Trieu E, Wu Y, Isenberg DA, Targoff IN. The association of anti-Ro52 autoantibodies with myositis and scleroderma autoantibodies. *J Autoimmun* 1999; 12(2):137-42.
- (50) Rutjes SA, Vree Egberts WT, Jongen P, Van Den Hoogen F, Pruijn GJ, van Venrooij WJ. Anti-Ro52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo-1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Clin Exp Immunol* 1997; 109(1):32-40.
- (51) Marie I. Morbidity and mortality in adult polymyositis and dermatomyositis. *Curr Rheumatol Rep* 2012; 14(3):275-85.
- (52) Espinosa A, Zhou W, Ek M, Hedlund M, Brauner S, Popovic K et al. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol* 2006; 176(10):6277-85.
- (53) Espinosa A, Hennig J, Ambrosi A, Anandapadmanaban M, Abenius MS, Sheng Y et al. Anti-Ro52 autoantibodies from patients with Sjogren's syndrome inhibit the Ro52 E3 ligase activity by blocking the E3/E2 interface. *J Biol Chem* 2011; 286(42):36478-91.
- (54) Aqrabi LA, Kvarnstrom M, Brokstad KA, Jonsson R, Skarstein K, Wahren-Herlenius M. Ductal epithelial expression of Ro52 correlates with inflammation in salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2014.
- (55) Marie I, Hatron PY, Dominique S, Cherin P, Mouthon L, Menard JF et al. Short-term and long-term outcome of anti-Jo1-positive patients with anti-Ro52 antibody. *Semin Arthritis Rheum* 2012; 41(6):890-9.
- (56) McEwan WA, Tam JC, Watkinson RE, Bidgood SR, Mallery DL, James LC. Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21. *Nat Immunol* 2013; 14(4):327-36.

- (57) Zhang Z, Bao M, Lu N, Weng L, Yuan B, Liu YJ. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 negatively regulates the innate immune response to intracellular double-stranded DNA. *Nat Immunol* 2013; 14(2):172-8.
- (58) Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 2000; 2(3):216-24.
- (59) Lundberg I, Ulfgren AK, Nyberg P, Andersson U, Klareskog L. Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 1997; 40(5):865-74.
- (60) Liao AP, Salajegheh M, Nazareno R, Kagan JC, Jubin RG, Greenberg SA. Interferon beta is associated with type 1 interferon-inducible gene expression in dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(5):831-6.
- (61) Cappelletti C, Baggi F, Zolezzi F, Biancolini D, Beretta O, Severa M et al. Type I interferon and Toll-like receptor expression characterizes inflammatory myopathies. *Neurology* 2011; 76(24):2079-88.
- (62) Gono T, Kaneko H, Kawaguchi Y, Hanaoka M, Kataoka S, Kuwana M et al. Cytokine profiles in polymyositis and dermatomyositis complicated by rapidly progressive or chronic interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)* 2014.