



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD DE POSGRADO**

**Programa de Maestría en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud**

TÍTULO DEL TRABAJO:

*Análisis de la Modulación Funcional de Células T Reguladoras Mediada por
Cbl-b en Pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado*

**MODALIDAD DE TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Médicas**

PRESENTA:

Jorge Rafael Romo Tena

TUTOR:

Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela
Departamento de Inmunología y Reumatología,
INCMNSZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Presidente: Dr. Rubén Burgos Vargas, Hospital General de México
Secretario: Dr. Luis Javier Jara Quezada, Centro Médico Nacional La Raza
Vocal I: Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela, INCMNSZ
Vocal II: Dra. Yolanda López Vidal, Facultad de Medicina UNAM
Vocal III: Dra. Virginia Pascual Ramos, INCMNSZ

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

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

Al Dr. Sergio Ponce de León y a la Dra. Marina Rull por todas las facilidades brindadas para poder cursar la maestría en Ciencias Médicas a la par de la especialización y subespecialización médicas.

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

A Ana y a Javier junto a quienes ha sido un honor recorrer este camino. A Sandra y a Luis por su valiosa colaboración en este proyecto de investigación.

A mis amigos Daniel, Héctor, Hernando, Lucía, Juan, Sergio y Sonia por siempre estar ahí y representar un aliciente en mi vida. A Alejandro, Arturo, Eduardo y Ossian por su invaluable apoyo y paciencia.

Gracias especiales al Dr. Rafael García Rascón, por la flexibilidad durante mi servicio social de la especialidad médica en el Hospital Regional de Alta Especialidad Ixtapaluca para poder seguir cumpliendo con mis actividades académicas correspondientes al programa de maestría.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen Ejecutivo	4
Marco Teórico	5
Planteamiento del Problema	9
Justificación	10
Pregunta de Investigación	11
Hipótesis	11
Objetivos	11
Material y Métodos	12
Consideraciones Éticas	14
Resultados	15
1. Características clínicas y demográficas de los pacientes con LEG.	15
2. Resistencia a la supresión por células T reguladoras en células T efectoras de pacientes con LEG.	16
3. Deficiencia en la expresión de la proteína Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG.	17
4. Resistencia a la supresión por células T reguladoras vía ubiquitinación de p27kip1.	19
Discusión y Conclusión	20
Referencias Bibliográficas	24

Resumen Ejecutivo

Marco teórico. El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por alteraciones en los mecanismos de tolerancia periférica, tales como la anergia y el efecto supresor mediado por células T reguladoras. Dichos mecanismos de tolerancia periférica, pueden ser modulados por el sistema de ubiquitinación, concretamente, por la ligasa de ubiquitina Cbl-b. Se desconoce si existen alteraciones en los mecanismos de regulación funcional de células T reguladoras mediada Cbl-b asociadas a la resistencia de células T efectoras a la supresión por células T reguladoras en pacientes con LEG.

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

Material y métodos. Se estudiaron 25 pacientes de 18 a 45 años con diagnóstico de LEG con base en los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología, que se encontraran activos sin tratamiento inmunosupresor o en remisión, así como 25 controles sanos ajustados por edad y sexo. De cada sujeto, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica mediante gradientes de densidad y células T efectoras ($CD4^+CD25^-$) y reguladoras ($CD4^+CD25^+CD127^-$) mediante microesferas magnéticas. Se evaluó la respuesta proliferativa en co-cultivos tanto autólogos como alogénicos mediante el protocolo CFSE por citometría de flujo. Se determinó la expresión de Cbl-b a nivel de proteína mediante Western Blot. Se realizó la comparación entre grupos por variable desenlace mediante t de Student o ANOVA, según fuera conveniente. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$. De cada sujeto se obtuvo un consentimiento informado y el protocolo contó con la aprobación del comité de ética institucional.

Resultados. De los 25 pacientes incluidos, 15 se encontraban activos sin tratamiento inmunosupresor y 10 se encontraban en remisión. El índice de actividad promedio (SLEDAI) para los pacientes activos fue de 16.0 puntos. Encontramos que las células T reguladoras de los pacientes con LEG mostraron una menor expresión de Cbl-b en comparación con los controles sanos (1.3 ± 1.0 vs 2.8 ± 1.8 , $p = 0.002$), lo cual se asoció a resistencia a la supresión en ensayos de proliferación ($r = 0.551$, $p = 0.042$). Asimismo, se documentó una tendencia a la disminución en la expresión del regulador del ciclo celular p27kip1 en células T reguladoras de los pacientes con LEG en comparación con controles sanos. También encontramos en ensayos de inmunoprecipitación, que p27kip1 interactúa con Cbl-b en células T reguladoras. No se encontraron diferencias significativas entre aquellos pacientes que se encontraban en remisión y aquellos con enfermedad activa.

Conclusión. Nuestros datos sugieren que la ligasa de ubiquitina Cbl-b es capaz de regular la interacción entre células T efectoras ($CD4^+CD25^-$) y reguladoras ($CD4^+CD25^+CD127^-$), particularmente, la resistencia a la supresión a través de la ubiquitinación del regulador del ciclo celular p27kip1 en pacientes con LEG. Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en demostrar que p27kip1 es capaz de interactuar con Cbl-b, lo cual puede constituir otro mecanismo mediante el cual esta ligasa de ubiquitina es capaz de modular el umbral de activación del receptor de células T.

Marco Teórico

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

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

Los mecanismos de tolerancia periférica, como la inducción de anergia y la función de las células T reguladoras, pueden ser modulados por el sistema de ubiquitinación [5]. Este sistema comprende la conjugación de ubiquitina, (proteína de 76 aminoácidos altamente conservada), a un sustrato protéico, con la modificación postraducciona de alta especificidad, dependiente e independiente de proteólisis.

El mecanismo de conjugación ubiquitina-proteína implica una secuencia de reacciones enzimáticas, que involucran tres diferentes tipos de enzimas: E1 (activadora), enzima conjugadora (E2) y, finalmente una ligasa de ubiquitina (E3) la cual transfiere la ubiquitina activada a un residuo de lisina en la proteína blanco, siendo este último paso el que brinda la especificidad al sistema [6, 7].

Recientemente se ha destacado el papel de ligasas de ubiquitina (E3), tales como Cbl-b (Casitas B lymphoma), GRAIL (Gene Related to Anergy in

Lymphocytes) e Itch, cuyos genes forman parte del programa inducido por calcio/calcineurina [8-10].

La expresión de Cbl-b induce anergia al producir una disminución en la fosforilación de la fosfolipasa C γ -1 (PLC γ -1). Ello altera las vías de señalización dependientes de calcio [11] y la formación de una sinapsis inmunológica efectiva [12, 13].

Asimismo, Cbl-b funciona como regulador negativo de la fosforilación de Vav 1, acoplando la proliferación y la producción de IL-2 a la presencia de coestimulación a través de CD28. Recientemente se ha descrito que Cbl-b es capaz de modular la función de la cadena ζ del receptor de células T (TCR) mediante la poliubiquitinación K-33, lo cual se asocia a inhibición de la fosforilación y su asociación con ZAP-70, mediante lo cual se bloquea la señalización a través del TCR [14]. También se ha reportado que la actividad catalítica de ligasa de ubiquitina de Cbl-b es esencial para la regulación de la funcionalidad en linfocitos T [15].

La ausencia de Cbl-b, como se observa en el ratón Cbl-b^{-/-}, se asocia al desarrollo de autoinmunidad espontánea e inmunopatología inducida por un reto antigénico [16, 17].

Las células T reguladoras en humanos se caracterizan por la expresión de diversas moléculas, dentro de las cuales se destacan la cadena α del receptor de IL-2 (CD25), así como el factor de transcripción FOXP3 (Forkhead box P3) y la ausencia o baja expresión de CD127 (receptor de IL-7) [18]. Esta subpoblación celular se considera indispensable para el mantenimiento de la tolerancia periférica y la homeostasis del sistema inmune.

Las células T reguladoras pueden dividirse en naturales, es decir provenientes del timo e inducibles [19], que pueden distinguirse con base en sus funciones y características fenotípicas. Desde el punto de vista funcional, las células T reguladoras se caracterizan por la capacidad de ejercer un efecto supresor tanto de la proliferación como de la respuesta efectora de diversas subpoblaciones celulares, tales como linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, y células NK [20, 21].

Las células T reguladoras ejercen su efecto supresor a través de diversos mecanismos, que incluyen la producción de citocinas supresoras, (i.e. IL-10[22], IL-35[23] y TGF- β [24]); citolisis mediada por granzimas [25]; alteraciones metabólicas como muerte por deprivación de citocinas y mediadores bioquímicos como la adenosina [26]; e inhibición de la maduración y función de células dendríticas [27]. Asimismo, se ha demostrado el requerimiento de la expresión de FOXP3 en células T reguladoras para su función supresora tanto *in vitro* como *in vivo* [28-30].

Las alteraciones tanto cuantitativas como funcionales de la subpoblación de células T reguladoras se han asociado al desarrollo y/o mantenimiento de diversas patologías autoinmunes, tanto órgano específicas como sistémicas, en modelos murinos y en humanos [19, 31-37].

El lupus eritematoso generalizado [38] es una enfermedad autoinmune crónica, que se considera el prototipo de las enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado que los pacientes con LEG tienen defectos en los mecanismos de tolerancia periférica [39, 40]. Sin embargo, estos no se han delineado con precisión. Existe evidencia que indica que las células T de los pacientes con LEG tienen un comportamiento anormal.

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

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

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

En experimentos realizados en nuestro laboratorio se ha documentado disminución en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b, tanto a nivel del RNAm como de la proteína en células T CD4⁺ de pacientes con LEG, lo cual se asoció con un fenotipo de resistencia a anergia, independientemente de la actividad de la enfermedad, lo cual sugiere que forma parte de los defectos intrínsecos en LEG [46].

Asimismo, nuestro grupo y otros han demostrado la presencia de resistencia a la supresión por células T reguladoras en pacientes con LEG, independientemente de la actividad de la enfermedad [47, 48], y de la ausencia o presencia de linfopenia [49].

Aunado a lo anterior, en el modelo murino Cbl-b^{-/-} se ha demostrado que la deficiencia de esta ligasa de ubiquitina se asocia a la resistencia de las células T efectoras (CD4⁺CD25⁻) al efecto supresor por las células T reguladoras. Específicamente se ha demostrado que esta resistencia se presenta en un contexto dependiente de TGF-β tanto *in vitro* como *in vivo* [50-52], lo cual a su vez se asoció con un defecto en la fosforilación de Smad2.

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

Planteamiento del Problema

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

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

Justificación

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

Por su parte, también es importante resaltar que recientemente se ha demostrado que la prevalencia en población catalogada como “hispana” es mayor a la reportada para otros grupos étnicos, llegando a ser de aproximadamente 94 casos por 100 000 individuos [53], mientras que en Estados Unidos se han reportado tasas entre 14.6 y 50.8 por 100 000 individuos [54].

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

ubiquitinación es de gran relevancia para ampliar el modelo fisiopatogénico de la enfermedad.

Pregunta de Investigación

¿Existen alteraciones en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b en células T reguladoras que se asocien a alteraciones en los mecanismos de regulación funcional y a la resistencia a su efecto supresor de dicha subpoblación celular en pacientes con LEG?

Hipótesis

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

Objetivos

General

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

Específicos

1. Evaluar la expresión de la proteína Cbl-b en células T reguladoras purificadas de pacientes con LEG bajo diferentes condiciones experimentales y en cocultivos con células T efectoras.

2. Evaluar la respuesta proliferativa en cocultivos de células T CD4⁺CD25⁻ (efectoras) y T reguladoras, tanto autólogos como alogénicos en pacientes con LEG y controles.

Material y Métodos

Pacientes y Controles. Se estudiaron 25 pacientes mayores de 18 años, con LEG diagnosticado en base a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología [55] provenientes del servicio de consulta externa de reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se obtuvo información clínica relevante a partir de su expediente. Se registró la actividad de su enfermedad el día de la toma de la muestra de acuerdo al índice SLEDAI [56].

Criterios de Inclusión

Pacientes:

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

Controles:

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

Criterios de Exclusión

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

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

Cálculo del tamaño de la muestra

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

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

$$N = 2.038/0.1225 = 16.7 = 17 \text{ sujetos por grupo (número mínimo)}$$

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

Estados Funcionales. Las células efectoras CD4⁺ CD25⁻ y células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ (purificadas) se estudiaron en diferentes estados: A)

Ex vivo: Sin ninguna manipulación; inmediatamente después de su obtención; B) Posterior al reposo: Se dejaron en reposo (RPMI 1640 adicionado con 10% de suero bovino fetal); C) Post activación: Se estimularon durante 48 horas con anti-CD3 unido a placa (5 µg/mL) y anti-CD28 soluble (2.5 µg/mL).

Ensayos funcionales. Cocultivos. Se realizaron cocultivos tanto autólogos como alogénicos, con las células efectoras CD4⁺ CD25⁻ y células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ (purificadas) ante el estímulo de activación y reposo.

Cuantificación de proliferación. Previo a la aplicación de los estímulos 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 [57].

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

Análisis Estadístico. Los resultados fueron expresados en términos de media y desviación estándar. Se realizó la comparación entre grupos por variable desenlace mediante t de Student y ANOVA, según fuera conveniente. Se consideró como significancia estadística una $p < 0.05$. El análisis se realizó con apoyo del programa estadístico SPSS para Windows versión 16.0.

Consideraciones Éticas

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

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

El protocolo de investigación contó con aprobación por el comité de ética institucional (Ref 441).

Resultados

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

Se reclutaron 25 pacientes y 25 controles sanos ajustados por edad y sexo. De los 25 pacientes con LEG incluidos, 15 se encontraban activos sin tratamiento inmunosupresor y 10 se encontraban en remisión. El índice de actividad promedio (SLEDAI) para los pacientes activos fue de 16.0 puntos (Tabla1).

	Media
Edad (años)	35.2
Mujeres	20/5
Tiempo desde el diagnóstico (años)	5.6
Tiempo en remisión (años)	4.5
SLEDAI (puntos)	16.0

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

2. Resistencia a la supresión por células T reguladoras en células T efectoras de pacientes con LEG.

En los cocultivos autólogos, las células T efectoras ($CD4^+CD25^-$) de los pacientes con LEG mostraron incremento en el índice de proliferación, mientras que en los cocultivos alogénicos las células T efectoras ($CD4^+CD25^-$) de los controles sanos mostraron una adecuada supresión (disminución en la proliferación) por las células T reguladoras de los sujetos con LEG ($r=0.553$, $p=0.041$) (**Figura 1**). Por lo tanto, en pacientes con LEG se demostró resistencia a la supresión por células T reguladoras ($CD4^+CD25^+CD127^-$) en comparación con controles sanos en los ensayos de proliferación (**Figura 2**).

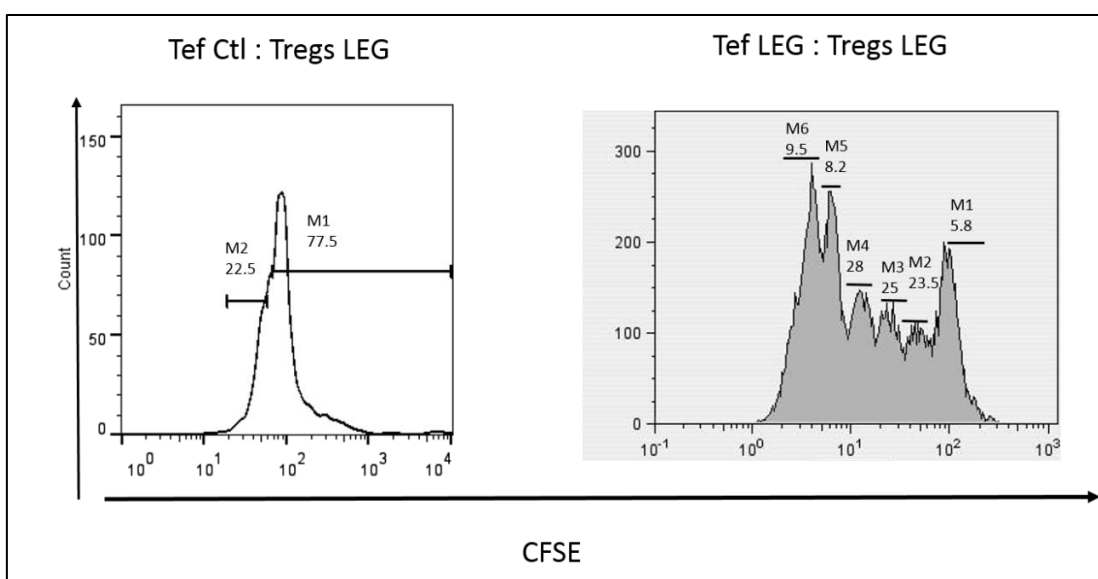


Figura 1. Resistencia de las células T efectoras al efecto supresor de células T reguladoras en LEG.

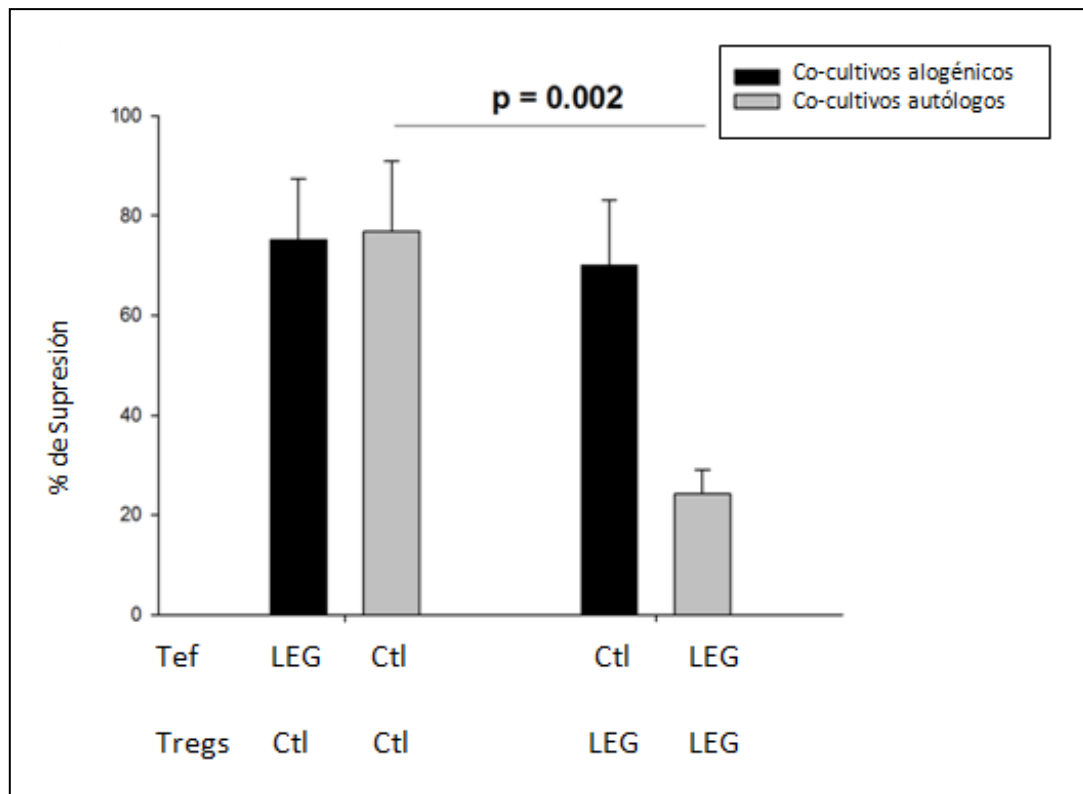


Figura 2. Porcentaje de supresión de la proliferación de células T efectoras de pacientes con LEG y controles sanos en presencia de células T reguladoras en cocultivos alogénicos y autólogos.

3. Deficiencia en la expresión de la proteína Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG.

La resistencia de las células T efectoras a la supresión por células T reguladoras se asoció a un defecto en la expresión de la proteína Cbl-b (1.32 ± 1.0 vs 2.8 ± 1.8 , $p=0.002$) en comparación con los controles sanos (**Figura 3**).

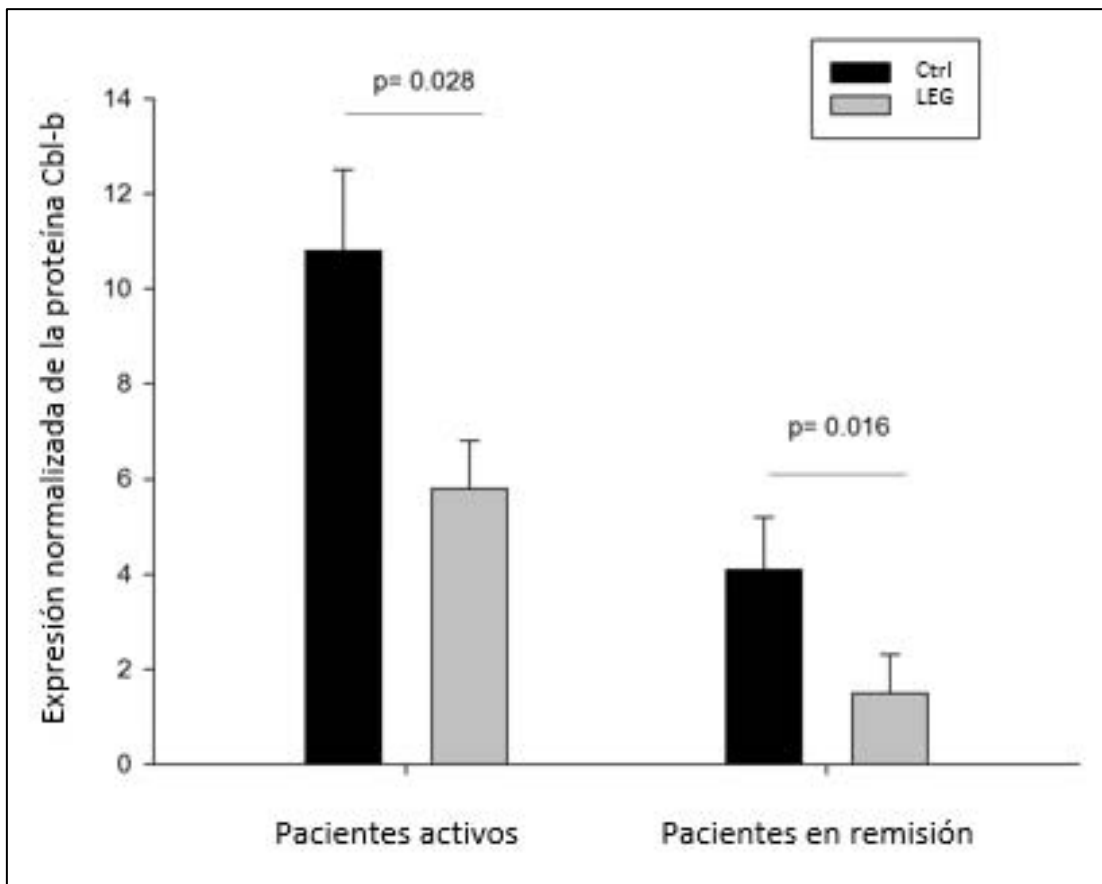


Figura 3. Expresión de la proteína Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG (activos y en remisión) y controles sanos.

No se encontraron diferencias significativas entre aquellos pacientes que se encontraban en remisión y aquellos con enfermedad activa (**Figura 4**).

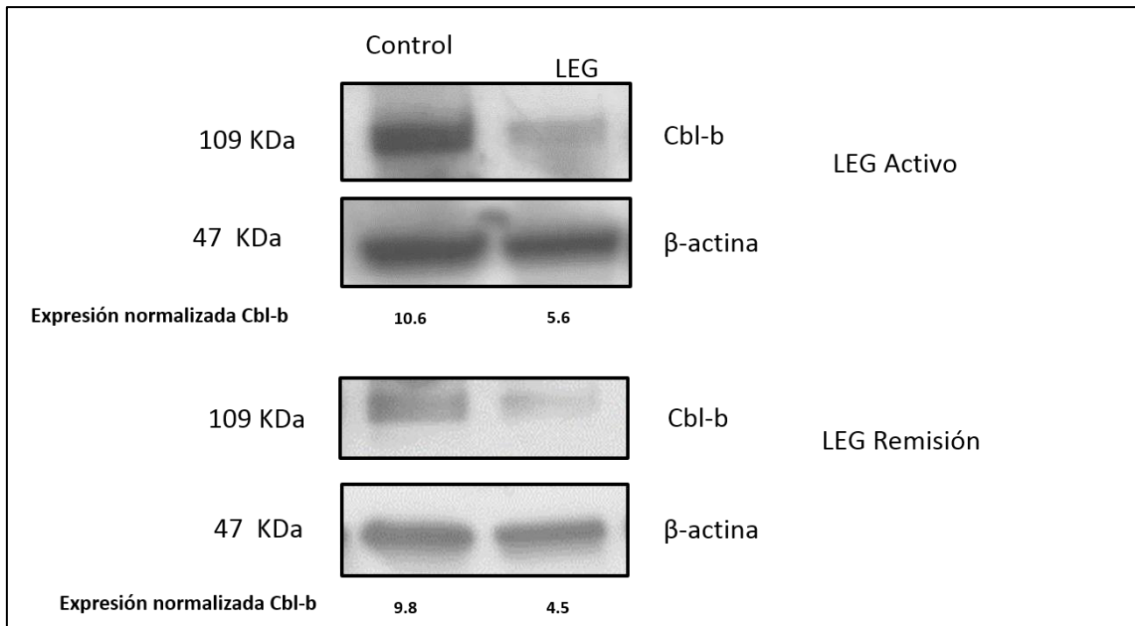


Figura 4. Expresión de Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG.

4. Resistencia a la supresión por células T reguladoras vía ubiquitinación de p27kip1.

Hubo una tendencia a la disminución en la expresión del regulador del ciclo celular p27kip1 en las células T reguladoras de los pacientes con LEG en comparación con los controles sanos (**Figura 5**).

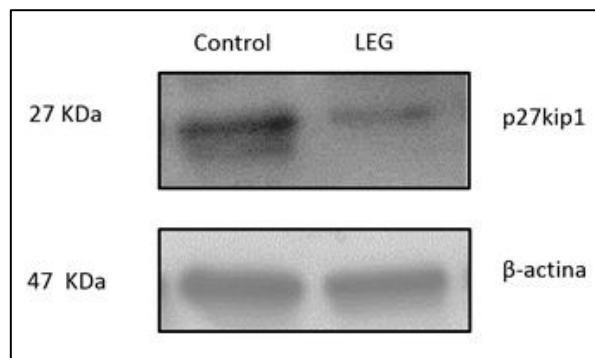


Figura 5. Expresión de p27kip1 en células T reguladoras de pacientes con LEG.

Asimismo, demostramos en ensayos de inmunoprecipitación la interacción entre p27^{kip1} y la ligasa de ubiquitina Cbl-b (**Figura 6**).

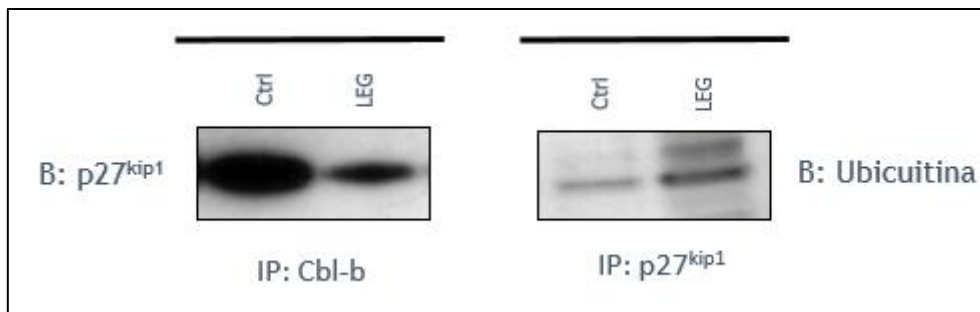


Figura 6. Cbl-b interactúa con p27^{kip1}.

Discusión y Conclusión

Encontramos en las células T de los pacientes con LEG resistencia a la supresión por células T reguladoras en términos de la respuesta proliferativa, y su asociación con la expresión defectuosa de la proteína Cbl-b. Hubo también una tendencia a la disminución en la expresión de p27^{kip1} en las células T reguladoras de los pacientes con LEG en comparación con lo obtenido en células de individuos sanos. Estos defectos pueden ser considerados intrínsecos, puesto que se presentan tanto en pacientes con enfermedad activa, como en aquellos en remisión.

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

El defecto en la expresión de Cbl-b en la población de células T efectoras en pacientes con LEG y su asociación con el fenómeno de resistencia a anergia, así como con múltiples defectos en la señalización a través del receptor de células T, ha sido demostrado previamente por nuestro grupo de investigación [46].

Debido a su relación con la resistencia a la respuesta supresora, se evaluó la expresión de diferentes sustratos de la ligasa de ubiquitina Cbl-b (p85PI3K, Vav1), siendo el regulador del ciclo celular p27kip1 el potencial sustrato para el cual se encontró una diferencia significativa en comparación con células T reguladoras de controles sanos. En efecto, se ha documentado que la deficiencia de p27kip1 en células T reguladoras se asocia al desarrollo de patología autoinmune en modelos murinos (artritis inducida por colágeno y LEG)[58]. Nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado previamente y denotan el papel del regulador del ciclo celular p27kip1 como una molécula clave para ciertos mecanismos de tolerancia periférica, como la anergia y la supresión por células T reguladoras. Nuestros datos sugieren que la ligasa de ubiquitina Cbl-b es capaz de regular la interacción entre células T efectoras y células T reguladoras, particularmente la resistencia a la supresión, vía la ubiquitinación de p27kip1 en pacientes con LEG. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio en demostrar que p27kip1 es capaz de interactuar con Cbl-b a través de ensayos de inmunoprecipitación, lo cual puede constituir otro mecanismo por el cual esta ligasa de ubiquitina es capaz de modular el umbral de activación del receptor de células T.

Se plantea evaluar en posteriores trabajos la expresión de otros potenciales sustratos de Cbl-b que participen en los mecanismos de regulación

funcional y en la resistencia a la supresión por células T reguladoras de pacientes con LEG. Goodman y cols describieron un aumento en la expresión de IL-6 en diversos tejidos en el contexto de patología autoinmune [59]. Esta citocina proinflamatoria inhibe la respuesta supresora por células T reguladoras y promueve la activación de diversos factores de transcripción, entre ellos Stat3, lo que promueve la expresión de células Th17 autorreactivas vía la expresión de ROR γ t e IL-23R. Estudiaron células T efectoras y reguladoras de controles sanos estimuladas con IL-6 en presencia o ausencia de inhibidores de Stat3. La presencia de IL-6 inhibió la supresión por células T reguladoras, misma que fue revertida tras inhibir la fosforilación de Stat3. Dichos trabajos sugieren que la resistencia a la respuesta supresora por células T reguladoras es dependiente de la señalización a través de Stat3. Proponemos Stat3 como otro potencial sustrato de la ligasa de ubiquitina Cbl-b, cuya deficiencia en células T reguladoras de pacientes con LEG puede llevar a la disminución en la degradación de Stat3 a través de la vía del proteosoma y por tanto a un incremento en la vía de señalización a través de dicha molécula y a la polarización hacia el linaje Th17. Se requieren más estudios para corroborar dicha hipótesis.

En resumen, las células T efectoras de los pacientes con LEG presentan resistencia a la supresión por células reguladoras, asociada a un defecto en la expresión de la ligasa de ubiquitina Cbl-b y del regulador del ciclo celular p27kip1. Dicho defecto puede ser considerado como intrínseco, ya que no depende de la actividad de la enfermedad. Lo anterior sugiere que la regulación del ciclo celular, específicamente el paso de la fase G1 a S, es un evento clave para la modulación de la tolerancia periférica tanto en células T efectoras como

en células T reguladoras. Nuestros hallazgos sugieren que p27kip1 es regulado por el sistema de ubiquitinación, concretamente, a través de la interacción con la ligasa de ubiquitina Cbl-b. El presente trabajo constituye la base para el estudio del papel de Cbl-b en la modulación funcional de células T reguladoras en pacientes con LEG.

Referencias Bibliográficas

1. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2010; **11**:21-7.
2. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**:305-34.
3. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**:490-500.
4. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; **11**:7-13.
5. Gomez-Martin D, Diaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J. Ubiquitination system and autoimmunity: the bridge towards the modulation of the immune response. *Autoimmun Rev* 2008; **7**:284-90.
6. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000; **22**:442-51.
7. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001; **70**:503-33.
8. Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 2002; **109**:719-31.
9. Liu YC. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**:81-127.
10. Heissmeyer V, Macian F, Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K, Gu H, Liu YC, Dustin ML, Rao A. Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nature immunology* 2004; **5**:255-65.
11. Jeon MS, Atfield A, Venuprasad K, Krawczyk C, Sarao R, Elly C, Yang C, Arya S, Bachmaier K, Su L, Bouchard D, Jones R, Gronski M, Ohashi P, Wada T, Bloom D, Fathman CG, Liu YC, Penninger JM. Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity* 2004; **21**:167-77.
12. Wells AD, Liu QH, Hondowicz B, Zhang J, Turka LA, Freedman BD. Regulation of T cell activation and tolerance by phospholipase C gamma-1-dependent integrin avidity modulation. *J Immunol* 2003; **170**:4127-33.
13. Naramura M, Jang IK, Kole H, Huang F, Haines D, Gu H. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nature immunology* 2002; **3**:1192-9.
14. Huang H, Jeon MS, Liao L, Yang C, Elly C, Yates JR, 3rd, Liu YC. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity* 2010; **33**:60-70.
15. Paolino M, Thien CB, Gruber T, Hinterleitner R, Baier G, Langdon WY, Penninger JM. Essential Role of E3 Ubiquitin Ligase Activity in Cbl-b-Regulated T Cell Functions. *J Immunol* 2011; **186**:2138-47.
16. Bachmaier K, Krawczyk C, Kozieradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveirados-Santos A, Mariathasan S, Bouchard D, Wakeham A, Itie A, Le J, Ohashi PS, Sarosi I, Nishina H, Lipkowitz S, Penninger JM. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 2000; **403**:211-6.
17. Chiang YJ, Kole HK, Brown K, Naramura M, Fukuhara S, Hu RJ, Jang IK, Gutkind JS, Shevach E, Gu H. Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* 2000; **403**:216-20.

18. de St Groth BF, Zhu E, Asad S, Lee L. Flow Cytometric Detection of Human Regulatory T Cells. *Methods Mol Biol* 2011; **707**:263-79.
19. Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 2011.
20. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; **193**:1285-94.
21. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001; **193**:1295-302.
22. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR, Jr., Muller W, Rudensky AY. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008; **28**:546-58.
23. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; **450**:566-9.
24. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; **194**:629-44.
25. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004; **104**:2840-8.
26. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 2007; **179**:3578-87.
27. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2006; **203**:505-11.
28. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3(+) regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**:119-30.
29. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2004; **6**:745-51.
30. Jang E, Cho WS, Cho ML, Park HJ, Oh HJ, Kang SM, Paik DJ, Youn J. Foxp3+ regulatory T cells control humoral autoimmunity by suppressing the development of long-lived plasma cells. *J Immunol* 2011; **186**:1546-53.
31. Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4+ regulatory cells as a potential immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; **360**:1647-61.
32. Hobeika AC, Morse MA, Osada T, Peplinski S, Lysterly HK, Clay TM. Depletion of human regulatory T cells. *Methods Mol Biol* 2011; **707**:219-31.
33. Kahaly GJ, Shimony O, Gellman YN, Lytton SD, Eshkar-Sebban L, Rosenblum N, Refaeli E, Kassem S, Ilany J, Naor D. Regulatory T-cells

- in graves' orbitopathy: baseline findings and immunomodulation by anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**:422-9.
34. Kollins D, Stoelcker B, Hoffmann U, Bergler T, Reinhold S, Banas MC, Rummele P, Farkas S, Kramer BK, Banas B. FOXP3+ regulatory T-cells in renal allografts: correlation with long-term graft function and acute rejection. *Clin Nephrol* 2011; **75**:91-100.
 35. Koyabu M, Uchida K, Miyoshi H, Sakaguchi Y, Fukui T, Ikeda H, Takaoka M, Hirohara J, Nishio A, Uemura Y, Uemoto S, Okazaki K. Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases. *J Gastroenterol* 2010; **45**:732-41.
 36. La Scaleia R, Morrone S, Stoppacciaro A, Scarpino S, Antonelli M, Bianchi E, Di Nardo G, Oliva S, Viola F, Cucchiara S, Santoni A, Palmieri G, Uccini S. Peripheral and intestinal CD4+ T cells with a regulatory phenotype in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; **51**:563-72.
 37. Lourenco EV, La Cava A. Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity* 2011; **44**:33-42.
 38. Bottomley MJ, Stier, G.,Pennacchini, D.,Legube, G.,Simon, B.,Akhtar, A.,Sattler, M.,Musco, G. NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* 2005; **280**:11505-12.
 39. Tsokos GC, Liossis SN. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today* 1999; **20**:119-24.
 40. Tsokos GC, Mitchell JP, Juang YT. T cell abnormalities in human and mouse lupus: intrinsic and extrinsic. *Curr Opin Rheumatol* 2003; **15**:542-7.
 41. Tsokos GC, Wong HK, Enyedy EJ, Nambiar MP. Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 2000; **12**:355-63.
 42. Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1982; **69**:1388-92.
 43. Kammer GM. Altered regulation of IL-2 production in systemic lupus erythematosus: an evolving paradigm. *J Clin Invest* 2005; **115**:836-40.
 44. Bouzazhah F, Jung S, Craft J. CD4+ T cells from lupus-prone mice avoid antigen-specific tolerance induction in vivo. *J Immunol* 2003; **170**:741-8.
 45. Yi Y, McNerney M, Datta SK. Regulatory defects in Cbl and mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-related kinase) pathways cause persistent hyperexpression of CD40 ligand in human lupus T cells. *J Immunol* 2000; **165**:6627-34.
 46. Gomez-Martin D, Ibarra-Sanchez M, Romo-Tena J, Cruz-Ruiz J, Esparza-Lopez J, Galindo-Campos M, Diaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J: Casitas B lineage lymphoma b is a key regulator of peripheral tolerance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 2013, **65**(4):1032-1042.
 47. Vargas-Rojas MI, Crispin JC, Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* 2008; **17**:289-94.

48. Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, Max R, Eckstein V, Blank N, Fiehn C, Ho AD, Lorenz HM. Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; **58**:2120-30.
49. Gomez-Martin D, Diaz-Zamudio M, Vanoye G, Crispin JC, Alcocer-Varela J. Quantitative and functional profiles of CD4(+) lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 2011.
50. Adams CO, Housley WJ, Bhowmick S, Cone RE, Rajan TV, Forouhar F, Clark RB. Cbl-b(-/-) T cells demonstrate in vivo resistance to regulatory T cells but a context-dependent resistance to TGF-beta. *J Immunol* 2010; **185**:2051-8.
51. Wohlfert EA, Callahan MK, Clark RB. Resistance to CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b-/- mice. *J Immunol* 2004; **173**:1059-65.
52. Wohlfert EA, Gorelik L, Mittler R, Flavell RA, Clark RB. Cutting edge: deficiency in the E3 ubiquitin ligase Cbl-b results in a multifunctional defect in T cell TGF-beta sensitivity in vitro and in vivo. *J Immunol* 2006; **176**:1316-20.
53. Walsh BT, Pope C, Reid M, Gall EP, Yocum DE, Clark LC. SLE in a United States-Mexico Border Community. *J Clin Rheumatol* 2001; **7**:3-9.
54. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006; **15**:308-18.
55. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; **25**:1271-7.
56. Guzman J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sanchez-Guerrero J, Alarcon-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992; **19**:1551-8.
57. Crispin J, Vargas-Rojas M, Alcocer-Varela J. Cell Proliferation Index. A reliable and validated method that quantifies cell proliferation according to CFSE dilution. *Clin Immunol* 2005; **115 (suppl 1)**:S267.
58. Iglesias M, Postigo J, Santiuste I, González J, Buelta L, Tamayo E, Merino J, Merino R. p27(Kip1) inhibits systemic autoimmunity through the control of Treg cell activity and differentiation. *Arthritis Rheum.* 2013 Feb;**65**(2):343-54.
59. Goodman WA, Young AB, McCormick TS, Cooper KD, Levine AD. Stat3 phosphorylation mediates resistance of primary human T cells to regulatory T cell suppression. *J Immunol.* 2011 Mar 15;**186**(6):3336-45.