



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES
INMUNORREGULADORES EN CÉLULAS LINFOIDES
DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

P R E S E N T A

ATENEA ESTELA ANDRÉS DIONICIO



México, D. F.

2004



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 10 del mes de agosto de 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH-IPN para examinar la tesis de grado titulada:

Análisis de la Expresión de Genes Inmunorreguladores en Células Linfoides de Pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico

Presentada por el alumno:

<u>Andrés</u> <small>Apellido paterno</small>	<u>Dionicio</u> <small>materno</small>	<u>Atenea Estela</u> <small>nombre(s)</small>						
		Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> </table>	0	0	1	4	9	7
0	0	1	4	9	7			

aspirante al grado de:

Maestro en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

Dr. José Moreno Rodríguez

Codirector

Dr. Guillermo Pérez Ishiwara

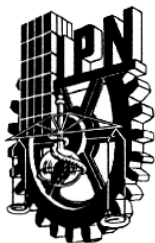
Dr. Francisco Medina Rodríguez

Dra. Paula Figueroa Arredondo

Dr. Juan Salas Benito

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Guillermo Pérez Ishiwara



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 10 del mes agosto del año 2004, el (la) que suscribe Atenea Estela Andrés Dionicio alumno (a) del Programa de Maestría en Biomedicina Molecular con número de registro 001497, adscrito a Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Moreno Rodríguez y cede los derechos del trabajo intitulado Análisis de la Expresión de Genes Inmunorreguladores en Células Linfoides de Pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ate_aeda@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atenea Estela Andrés Dionicio

Nombre y firma

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. José Moreno Rodríguez.

Este proyecto fue apoyado por:

Beca Institucional otorgada por el Instituto Politécnico Nacional, de agosto 2000 a diciembre 2002.

Beca otorgada por el Programa Institucional de Formación de Investigadores, de agosto 2001 a junio 2003.

Beca otorgada por el Instituto Mexicano del Seguro Social, de marzo 2002 a diciembre 2004.

Agradecimientos

Al Dr. José Moreno por darme la oportunidad, la libertad y la independencia de realizar este trabajo en su laboratorio, por toda la guía académica proporcionada durante el desarrollo del. Sobre todo gracias por la paciencia y el apoyo en los momentos de crisis.

Al Dr. Francisco Medina por su asesoría en la selección de pacientes y en la mejor comprensión del aspecto clínico del proyecto.

A los Drs. Guillermo Pérez, Paula Figueroa y Juan Salas por sus sugerencias y aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A los compañeros de la UIMEA: Paty, Ericka, Gibrán, Abigail, Augusto y Rosario por toda su ayuda y compañía durante mi estancia. Gracias a Emmanuel Carmona por su colaboración en la selección de pacientes.

Al Biol. Sergio Pastén, por su valiosa contribución en el análisis estadístico.

A Leonor Enciso por su cooperación en la realización de las reacciones de PCR.

A Laura Enciso y a Evita, muchas gracias por aligerar un poco mi vida de estudiante al ayudarme a realizar los múltiples trámites académicos y burocráticos.

Dedicatoria

A mi familia.....

A mi mamá, Ana Laura, no hay palabras para agradecer todo lo que de ti he recibido, eres un magnífico ejemplo y gracias a ti ahora soy capaz de realizar cualquier cosa. Gracias por abrir la puerta a la realización de mis sueños.

A mis hermanos Arquímedes, Afrodita, Artemiza y América, más que hermanos son mis mejores amigos, mis amigos de siempre. Sé que a donde quiera que vaya y haga lo que haga ustedes estarán conmigo.

A mis sobrinitos París y Zahid, ustedes son aire fresco, me recuerdan lo bello que es ver el mundo con inocencia e ingenuidad.

A mi papá, Rogelio, eres la luz permanente en mi vida, la presencia constante que me acompaña y me cuida.

A mis amigos Lupita, Judith, Laura, Sergio, Elizabeth, Ricardo y Miguel Ángel, gracias por brindarme su amistad y ayudarme a superar muchas crisis existenciales.

A Fer, gracias por tu compañía y apoyo incondicionales, has influido en forma importante en mi crecimiento profesional y personal.

Gracias a todos ustedes, que de una u otra forma han tocado mi vida y han contribuido a hacer de mi lo que ahora soy. Así que, veamos lo que han creado.....

Índice

	Página
Abreviaturas	9
Índice de Figuras	11
Índice de Tablas	12
Resumen	13
Summary	15
1. Introducción	17
1.1. Respuesta Inmune	17
1.1.1. Activación Celular	19
1.1.2. Ontogenia de los Linfocitos B y T e Inducción de Tolerancia Inmunológica	22
1.1.3. Homeostasis Celular e Inmunorregulación	24
1.2. Autoinmunidad	30
1.2.1. Lupus Eritematoso Sistémico	32
1.2.2. Estudios en Modelos Murinos	36
2. Justificación	41
3. Planteamiento del problema	42
4. Hipótesis	43
5. Objetivo General	44
6. Objetivos Particulares	44
7. Materiales y Métodos	45
8. Resultados	53
9. Discusión	75
10. Conclusiones	79
11. Perspectivas	80
12. Apéndices	81
13. Bibliografía	90

Abreviaturas

ANA	Anticuerpos antinucleares
BCR	Receptor del linfocito B
Cbl-b	<i>Cas-Br-b</i> . Ligasa de ubiquitina tipo E3
cDNA	DNA complementario
CMN	Células mononucleares
CPA	Célula presentadora de antígeno
Csk	<i>C-Scr tyrosine Kinasa</i> . Tirosina cinasa tipo Src
Cu	Ciclo umbral
FAM	Carboxi-fluoresceina
HPRT	<i>Hipoxantine-phosphoribosil-transferase</i> . Hipoxantina-fosforibosil transferasa
IL	Interleucina
ITAM	Dominios ricos en tirosina activadores de inmunorreceptores
ITIM	Dominios ricos en tirosina inhibidores de inmunorreceptores
JOE	6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceina
KO	Ratón knock out
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LUX	<i>Light Upon eXtensión</i> .
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NFATc-1	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells Cytoplasmic, calcineur-independent 1</i> . Factor de transcripción de linfocitos T activados
NK	Células asesinas naturales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMA	Forbol-acetato miristato
PTK	Proteína tirosina cinasa

PTP-PEST	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 12</i> . Tirosina fosfatasa 12
RNA _m	RNA mensajero
ROX	Carboxi-X-rodamina
SHP-2	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 11</i> . Tirosina fosfatasa 11
SLEDAI	Índice de actividad del Lupus Eritematoso Sistemico
SOCS-1	<i>Supresor Of Cytokine Signaling 1</i> . Supresor de la señalización por citocinas-1
TCR	Receptor del linfocito T
TGF- β	Factor de crecimiento y transformación
TLR	Receptores tipo toll

Índice de Figuras

		Página
Figura 1	Transducción de señales durante la presentación de antígeno a los linfocitos T	21
Figura 2	La combinación ionomicina/PMA induce activación de linfocitos T y B a las 24 h	55
Figura 3	Especificidad de las reacciones de PCR	57
Figura 4	Clonación del fragmento de 540pb del gen β -actina humana	58
Figura 5	Curva estándar de concentración de β -actina	60
Figura 6	Regresión lineal de la curva estándar de concentración de β -actina	61
Figura 7	Ejemplo de ensayo de PCR en tiempo real	63
Figura 8	Comprobación de la especificidad de la reacción de PCR en tiempo real mediante curvas de disociación	64
Figura 9	Subexpresión de Cbl-b en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo	67
Figura 10	Subexpresión de PTP-PEST en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo y activo	67
Figura 11	Subexpresión de SHP-2 en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo y activo	68
Figura 12	Subexpresión moderada de SOCS-1 en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo	68
Figura 13	Subexpresión de NFATc-1 en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo y activo	69
Figura 14	El nivel de expresión de Csk es normal en las células linfoides no activadas y activadas de pacientes con LES	69
Figura 15	Sobreexpresión de IL-2 en las células linfoides no activadas de pacientes con LES	70
Figura 16	El nivel de expresión génica de PTP-PEST en pacientes con LES activo no está relacionado con la actividad de la enfermedad	71
Figura 17	El nivel de expresión génica de SHP-2 en pacientes con LES activo no está relacionado con la actividad de la enfermedad	71

Figura 18	El nivel de expresión génica de NFATc-1 en pacientes con LES activo no está relacionado con la actividad de la enfermedad	72
Figura 19	El nivel de expresión génica de IL-2 en pacientes con LES activo no está relacionado con la actividad de la enfermedad	72
Figura 20	El nivel de expresión génica de Cbl-b en células linfoides de pacientes con LES no está relacionado con manifestaciones clínicas específicas	74

Índice de Tablas

		Página
Tabla 1	Iniciadores LUX	48
Tabla 2	Características de las mujeres incluidas en el estudio	54
Tabla 3	Pacientes y controles incluidos en el estudio	56
Tabla 4	Curva estándar de concentración del plásmido <i>pCR-Blunt II TOPO</i> clonado con el fragmento de 540 pb del gen β -actina humano	59
Tabla 5	Ciclo umbral de la curva estándar de concentración del plasmido clonado con un fragmento del gen β -actina humano	61

Resumen. Análisis de la Expresión de Genes Inmunorreguladores en Células Linfoides de Pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico

La patogenia de las enfermedades autoinmunes es compleja y los mecanismos que intervienen en su desarrollo son, en su mayoría, desconocidos. La homeostasis inmunológica depende de la interacción entre las señales positivas que inducen activación celular y por lo tanto una respuesta inmune productiva, y las señales negativas que controlan la magnitud de las primeras y que son esenciales para mantener la tolerancia inmunológica y prevenir la autoinmunidad. Las señales negativas van desde los linfocitos T reguladores, la señalización por moléculas de superficie que activan sistemas inhibitorios y las moléculas intracelulares que controlan negativamente la transducción de señales. El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune generalizada, que se caracteriza por hiperactividad de linfocitos B y T, aunque la causa de esta alteración no es del todo conocida. En ratones, la inactivación de genes que codifican moléculas implicadas en la homeostasis intracelular de linfocitos B y/o T resulta en un proceso de autoinmunidad muy semejante al LES.

En este trabajo se examinó la expresión de genes que codifican moléculas importantes para la homeostasis intracelular en linfocitos de pacientes con LES e individuos sanos. Se estudiaron 17 pacientes del género femenino con LES, clasificadas de acuerdo al grado de actividad (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*, SLEDAI). Siete de ellas presentaron LES inactivo y diez tenían diversos grados de actividad de la enfermedad. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CM) por gradientes de Ficoll-Hypaque y se analizaron ya sea en reposo o después de 24 horas de activación con ionomicina-PMA. Se obtuvo el RNA mensajero (poli-A) y se sintetizó cDNA, que se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real con un sistema de iniciadores fluorescentes específicos para los siguientes genes: Cbl-b, Csk, NFATc-1, PTP-PEST, SHP-2 y SOCS-1. Se incluyeron IL-2 y β -actina como controles de activación y de expresión

constitutiva, respectivamente. Los resultados se examinaron mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para datos no paramétricos.

Las células no activadas, tanto de LES inactivo como activo, presentaron un incremento en la expresión de IL-2, así como una disminución de NFATc-1, PTP-PEST y SHP-2. Los linfocitos no activados de las pacientes con lupus inactivo tuvieron, además, una expresión disminuida de Cbl-b y SOCS-1. Ninguna de estas alteraciones fueron observadas después de activar las células de las pacientes con LES. Así, los linfocitos de pacientes con LES tienen importantes alteraciones en la expresión de genes que codifican proteínas esenciales en la homeostasis y en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, principalmente SHP-2, PTP-PEST y NFATc-1 cuya deficiencia lleva a hiper-reactividad de linfocitos B. Estas anomalías no son intrínsecas de las células ya que la subexpresión dejó de observarse después de que fueron activadas con ionomicina/PMA, un proceso que no incluye receptores de membrana. Estos resultados sugieren que al menos algunos pacientes con LES tienen deficiencias en la señalización por moléculas de superficie celular, que finalmente llevan a la expresión de genes que codifican proteínas importantes en la regulación de la activación celular.

Summary. Analysis of the Expression of Immunoregulatory Genes by Systemic Lupus Erythematosus Lymphocytes

The pathogenesis of autoimmune diseases is complex and the pathways leading to their development are generally unknown. Immunological homeostasis depends on the interaction of positive signals inducing cellular activation and a productive immune response, and negative signals controlling the magnitude of positive signals that are essential to maintain immunological tolerance and to prevent autoimmunity. Negative signals include regulatory T cells, triggering of inhibitory systems by membrane signaling and negative control of transduction signals by intracellular molecules. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by B and T cell hyperactivity, although the basis for such alteration is unknown. In mice, the inactivation of genes encoding a number of molecules involved in intracellular homeostasis of T and/or B cells results in SLE-like autoimmune diseases.

In this work, we examined the expression of genes encoding a set of important molecules for intracellular homeostasis of lymphocytes in SLE patients and healthy individuals. Seventeen SLE patients, classified by activity index (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*, SLEDAI) were studied. Seven were inactive and 10 had different degrees of disease activity. Monocyte-depleted peripheral blood mononuclear cells obtained by Ficoll-Hypaque gradients were activated or not with ionomycin-PMA for 24 hours. From cells were isolate mRNA and cDNA was synthesized and employed in quantitative real time PCR using specific fluorescent primers for the following genes: Cbl-b, Csk, NFATc-1, PTP-PEST, SHP-2 and SOCS-1. IL-2 and β -actin were included as activation and constitutive expression controls, respectively. Statistical analysis was performed by the Kruskal-Wallis and U-Mann-Whitney tests for non parametric data.

Non-activated SLE cells from both inactive and active patients had an increased expression of IL-2, as well as a decrease in the expression of NFATc-1, PTP-PEST, SHP-2. Non-activated lymphocytes from inactive SLE patients also had a decreased

expression of Cbl-b and SOCS-1. None of these alterations were seen after activation of SLE lymphocytes. Thus, lymphocytes from SLE patients have important alterations in gene expression of proteins that are essential for immunological homeostasis and to maintain immunological tolerance, mainly SHP-2, PTP-PEST and NFATc-1, leading to B cell hyperactivity. However, these abnormalities are not intrinsic because they reverted after cells were treated with ionomycin-PMA, which bypass cell surface receptors. The results suggest that at least some SLE patients have abnormal signaling through cell surface molecules leading to the expression of genes encoding proteins involved in the regulation of cell activation.

1. Introducción

1.1 Respuesta inmune

El sistema inmune permite al organismo eliminar agentes externos o internos, que pudieran ser potencialmente nocivos. Dependiendo de sus vías de activación y mecanismos efectores, la inmunidad se divide en innata y adaptativa. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa, después de las barreras epiteliales y tiene especificidad limitada. En ella participan diversas células, como los leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK), entre otras, además de moléculas como las proteínas del complemento, las diversas proteínas de fase aguda, las defensinas, etc. Esta respuesta se activa a través de receptores expresados principalmente en la superficie de las células dendríticas y de los macrófagos, de los cuales los mejor caracterizados y probablemente más importantes son los receptores tipo toll (TLR), cuyos ligandos son moléculas de composición diversa cuya característica principal es tener patrones moleculares repetitivos (PAMP) y que son especialmente abundantes en microorganismos, como bacterias y hongos, aunque algunas moléculas de la misma especie son también capaces de activar algunos TLR. Además de estos elementos con especificidad limitada o inespecíficos, la inmunidad innata es mediada también por algunas células que, aún siendo específicas, no generan memoria inmunológica. Estas son los linfocitos B1, las células NK y las células NKT, que tienen receptores específicos, pero que responden a moléculas predeterminadas y que probablemente son una línea intermedia de defensa entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Coutinho and Poltorack, 2003; Medzhitov and Janeway, 2003).

La respuesta inmune adaptativa es más sofisticada, filogenéticamente más reciente (está presente sólo en vertebrados) y es mediada por los linfocitos B (del subtipo B2) y los linfocitos T. Estas células tienen la capacidad de reconocer y eliminar de forma específica agentes nocivos para el organismo mediante receptores de antígeno altamente diversos y distribuidos clonalmente.

El evento inicial de la respuesta inmune adaptativa es la unión del antígeno a receptores específicos en la superficie de los linfocitos B y/o T. El receptor del linfocito B (BCR) es una forma transmembranal de inmunoglobulina, similar a los anticuerpos que habrá de secretar, cuya principal característica es la variabilidad clonal de aminoácidos en su extremo amino-terminal. Los linfocitos T, por su parte, tienen también un receptor (TCR) con variabilidad clonal, pero que sólo está formado por dos cadenas polipeptídicas, denominadas α y β , que no es secretado, sino únicamente expresado en su membrana y que permite a la célula expandirse como célula efectora en una respuesta inmune sólo en presencia del antígeno reconocido por su TCR (Abbas and Lichtman, 2003).

Los genes que codifican las inmunoglobulinas y el TCR tienen características similares. En primer lugar, constan de múltiples segmentos que deben ser procesados durante la ontogenia celular para generar los genes maduros de los receptores. La existencia de múltiples segmentos en cada uno de estos genes permite crear combinaciones que dan lugar a una amplia diversidad de receptores. En segundo lugar, en las células somáticas, los genes de los receptores se encuentran en línea germinal, mientras que en linfocitos T y B, los genes de las cadenas α y β del TCR y de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas, respectivamente, se encuentran rearrreglados, debido a que, durante la ontogenia de los linfocitos T y B, los genes del TCR y de las inmunoglobulinas, respectivamente, sufren una recombinación de dos o tres segmentos génicos distintos dando lugar a las regiones variables de sus receptores. Cada rearrreglo resulta en un anticuerpo (o un TCR) diferente y es característico de una clona. Como los rearrreglos son aleatorios (no son dirigidos por el antígeno), los receptores de los linfocitos T y B pueden ser específicos contra prácticamente cualquier antígeno, ya sea extraño o propio. Así, durante la ontogenia, además de los linfocitos T y B específicos contra antígenos extraños, surgen otros que reconocen antígenos propios (autorreactivos), que constituyen un riesgo potencial para el desarrollo de autoinmunidad patológica o enfermedad autoinmune (Moreno, 1996; Abbas and Lichtman, 2003).

1.1.1. Activación celular

Posterior a la ontogenia, los linfocitos T y B se distribuyen en el tejido linfoide, donde interactúan con los antígenos, lo cual es diferente para cada tipo. Los linfocitos B reconocen antígenos en forma directa, sin modificaciones, a través de su BCR, es decir, reconocen esencialmente antígenos nativos, ya que su respuesta está dirigida a bloquear o neutralizar a los agentes invasores, recubriendo sus antígenos de superficie, previniendo así su unión a receptores y facilitando su eliminación por medio de fagocitosis. Por otro lado, el TCR, en los linfocitos T, reconoce antígenos sólo después que éstos han sido modificados intracelularmente a fragmentos menores (generalmente péptidos derivados de antígenos proteicos), unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula presentadora de antígenos (CPA) (Moreno, 1996; Wang *et al*, 1998;).

El reconocimiento del antígeno por los linfocitos T y/o B específicos es un evento necesario pero insuficiente para el inicio de la inmunidad adaptativa. Para ello, los linfocitos deben ser activados al recibir, al menos, dos señales: una específica mediada por el receptor (TCR en linfocitos T y BCR en linfocitos B), y una segunda señal, conocida como coestimulación, que es mediada por los receptores CD28 en linfocitos T y CD40 en linfocitos B (Dustin, 2002). La transducción combinada de estas señales genera la cascada de eventos bioquímicos que llevan a la activación, proliferación y diferenciación celular. En el caso de los linfocitos T, las CPA expresan CD80 y CD86, que son los ligandos del receptor coestimulador CD28. Las únicas células capaces de expresar estos ligandos son las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos y se conocen como CPA profesionales. Para los linfocitos B, el ligando de CD40 es la molécula CD154, expresada por linfocitos T activados (Dustin, 2002; Frauwirth and Thompson, 2002).

El TCR se expresa en la superficie asociado al complejo hexamérico CD3 que está formado por una cadena γ , una δ , dos ϵ y dos ζ , las cuales transducen al citoplasma las señales provenientes del TCR. El estímulo primario en linfocitos T es el reconocimiento, por el TCR, de péptidos antigénicos unidos a moléculas del MHC en la superficie de una CPA profesional. Esto activa una cascada de proteína cinasas, iniciando con la cinasa de la familia *Src Lck*, que fosforila sitios denominados ITAM (del inglés *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*), o “dominios ricos en tirosina activadores de inmunorreceptores” en el complejo CD3 ζ . Esto genera sitios de unión para dominios SH2 (dominios homólogos a *Src* tipo 2) en la proteína-cinasa de la familia *Syk*, ZAP-70, la cual unida a CD3 ζ se activa al ser fosforilada por las cinasas *Lck* y *Fyn*, y fosforila a la proteína adaptadora LAT. Esta une, a su vez, los adaptadores Gads y SLP-76 formando el trímero LAT-Gads-SLP-76, donde las dos últimas también son fosforiladas por ZAP-70, generando el sitio de unión para la proteína-cinasa de la familia *Tec*, *Itk*. LAT, además une la fosfolipasa $C\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$), que es fosforilada y activada por ZAP-70 e *Itk* (Figura 1). En la respuesta inicial (respuesta primaria), la señal de coestimulación es mediada por el receptor CD28 en el linfocito T y CD80/86 en la CPA (Billadeau and Leibson, 2002; Leo and Schraven, 2002; Singer and Koretzky, 2002).

El estímulo primario en los linfocitos B es la unión del antígeno nativo al BCR. La señal de coestimulación depende de la interacción del receptor CD40 en el linfocito B con su ligando CD154, en el linfocito T. La serie de eventos desencadenados por estas interacciones es muy similar a lo que ocurre en los linfocitos T. En este caso las moléculas que participan son $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ (complejo asociado al BCR análogo a CD3 con el TCR), *Lyn*, *Syk*, SLP-65, PLC $\gamma 2$ y *Ptk* (Gauld *et al*, 2002; Leo and Schraven, 2002).

IL-5, IFN γ y TNF, además de los ligandos de CD40 y CD95 y otros genes indispensables para generar una respuesta inmune productiva (Chuvpilo *et al*, 2002).

Por el contrario, cuando hay reconocimiento del antígeno en ausencia de señales de coestimulación, hay una gran liberación de calcio lo que causa activación predominante de NFATc-1 en vez de AP-1 y la subsecuente transcripción de genes asociados con anergia, generando un estado de tolerancia inmunológica (Macian *et al*, 2002).

1.1.2. Ontogenia de los linfocitos B y T e inducción de tolerancia inmunológica

Durante la ontogenia, los genes que codifican los receptores de antígeno de los linfocitos B y T (BCR y TCR, respectivamente) sufren un rearrreglo génico aleatorio que da lugar a sus receptores de antígeno, que incluyen especificidades hacia lo propio y hacia lo no propio. Posteriormente, los linfocitos son sometidos a procesos de selección positiva y negativa, cuyo fin es seleccionar células con receptores útiles y eliminar aquéllas que reconocen autoantígenos, respectivamente, lo cual permite que sobrevivan únicamente los linfocitos capaces de reconocer antígenos extraños, muchos de los cuales están presentes en los agentes nocivos. A estos procesos de selección se les conoce como inducción de tolerancia inmunológica (Kamradt and Mitchison, 2001).

La inducción de tolerancia central de linfocitos T ocurre en el timo, en donde los timocitos (precursores de linfocitos T) pasan por procesos de selección positiva y negativa. Así, los timocitos inmaduros que reconocen antígenos con afinidad baja a intermedia, continúan su proceso de maduración (selección positiva), mientras que los linfocitos que no reconocen antígenos o que tienen alta afinidad son eliminados, ya sea por apoptosis (delección clonal), o inactivados (anergia clonal). Los primeros por no ser útiles y los segundos por ser peligrosos (autorreactivos). En esta etapa los antígenos que mayor probabilidad tienen de encontrarse con los linfocitos son los

autoantígenos (Miller and Basten, 1996; Kamradt and Mitchison, 2001). Este proceso no es absoluto, ya que aparentemente algunos linfocitos T CD4+, que reconocen autoantígenos con alta afinidad, y que además presentan la molécula CD25, no son eliminados sino que se diferencian a linfocitos T reguladores (Weigle and Romball, 1997; Sakaguchi, 2001).

En el caso de los linfocitos B, aquellos que reconocen antígenos propios son silenciados mediante tres posibles mecanismos, que incluyen la delección clonal de linfocitos B inmaduros, ya sea en médula ósea o en bazo, la inactivación o anergia clonal y la edición del receptor (Goodnow *et al*, 1995). Este último mecanismo consiste en un nuevo rearrreglo del gen de cadena ligera de las inmunoglobulinas, lo cual cambia su especificidad, probablemente a una no autorreactiva (Pelanda *et al*, 1997). Otro mecanismo de tolerancia de los linfocitos B es la ausencia de los linfocitos T colaboradores específicos contra el mismo antígeno, las cuales son necesarias para que los linfocitos B se diferencien a células plasmáticas productoras de anticuerpos (Goodnow *et al*, 1995; Miller and Basten, 1996).

Los linfocitos autorreactivos que escapan a la tolerancia central son nuevamente sujetos de este tipo de procesos en los órganos linfoides periféricos. Así, los linfocitos B maduros que reconocen autoantígenos con alta afinidad en ausencia de linfocitos T contra el mismo antígeno son eliminados en los centros germinales. Los linfocitos T que reconocen autoantígenos con alta afinidad en ausencia de señales de coestimulación, o bien, recibiendo señales reguladoras a través de otros receptores de superficie (ver abajo), son inactivados (anergizados) por lo que, subsecuentemente, pierden la capacidad de responder al autoantígeno (Hämmerling *et al*, 1993; Miller and Basten, 1996; Parijs and Abbas, 1998).

Otro mecanismo de tolerancia son los linfocitos T reguladores (CD4+CD25+), algunos de los cuales secretan citocinas que disminuyen e inhiben la respuesta inmune, como la interleucina (IL)-10 y el factor de crecimiento y transformación β

(TGF β 1) que inhiben respuestas de linfocitos B y T (Weigle and Romball, 1997; Sakaguchi, 2000; Maloy and Powrie, 2001; Sakaguchi, 2001).

Los linfocitos T o B que no interaccionan con el antígeno, durante la ontogenia o en las condiciones necesarias para inducir anergia, ya sea por concentraciones insuficientes o por inaccesibilidad, permanecen en un estado conocido como ignorancia inmunológica (Moreno, 1996).

En resumen, la inmunidad hacia lo extraño es un mecanismo esencial para sobrevivir en un mundo poblado por agentes patógenos. Sin embargo, dada su gran capacidad destructiva, debe ser estrechamente regulada para evitar o minimizar el daño al propio organismo. Un factor importante de riesgo es la ignorancia inmunológica, la cual no es tolerancia, ya que cualquier evento que aumente las concentraciones de un autoantígeno o que lo hagan más accesible, podría activar la respuesta inmune, dando lugar a un proceso patológico conocido como enfermedad autoinmune (Moreno, 1996). Para lo anterior, existen mecanismos adicionales de tolerancia que consisten en el control homeostático de la activación celular, lo cual ocurre a través de diversos mecanismos.

1.1.3. Homeostasis celular e inmunorregulación

La activación celular lleva a la proliferación de las clonas específicas para el antígeno que inició la respuesta inmune. Para controlar la magnitud de la respuesta o para revertirla cuando el estímulo antigénico ha desaparecido, es necesario que las células efectoras generadas sean reguladas negativamente o eliminadas mediante apoptosis inducida por activación. Estos procesos que mantienen la homeostasis inmunológica permiten mantener constante y en reposo el número de las diferentes poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune (Theofilopoulos *et al*, 2001; Seddon and Zamoyska, 2003).

Las células sobrevivientes después de una respuesta inmune, incluyendo las de memoria, deben regresar al estado de reposo para poder responder a un nuevo estímulo antigénico. Esto se logra mediante mecanismos de homeostasis intracelular del sistema inmune, dependiente de proteínas reguladoras que tienen un efecto negativo o inhibitorio de la activación celular. Lo anterior ocurre ya sea por activación intracelular directa o por la interacción de receptores de superficie con ligandos que dan a las células señales inhibitorias, generalmente con el objeto de terminar o limitar la magnitud de una respuesta inmune y de prevenir su activación por estímulos triviales (Koretzky, 2002).

Las proteínas de regulación negativa pueden tener diversas funciones. Pueden ser moléculas de superficie, enzimas o simplemente adaptadores para otras proteínas con función reguladora (Janssen and Zhang, 2003).

Por su localización subcelular, las proteínas reguladoras pueden clasificarse en transmembranales o citosólicas. Las transmembranales suelen tener, en su región citoplásmica, dominios ricos en tirosina inhibidores de inmunorreceptores (ITIM's, del inglés *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs*), de efecto antagónico a los ITAM's, mientras que las proteínas citosólicas pueden tener diversas actividades enzimáticas, como fosfatasas, cinasas y ligasas de ubiquitina entre otras (Ravetch and Lanier, 2000; Billadeau and Leibson, 2002). Entre las proteínas capaces de regular negativamente la función celular se encuentran: CTLA-4, FcγRIIB, SIT, CD94/NKG2, KIR's, PIR-B, LAIR-1, CD22, SIRP, PAG, Csk, SLAP, Dok, Cbl, SOCS-1, SHP-1,-2, Gab2, SAP, TSA, Lnk, DAPP1, PEP, ILT, LAX, PTP-PEST, SHIP, Ly49, y posiblemente muchas otras aún no descritas (Ravetch and Lanier, 2000; Billadeau and Leibson, 2002; Leo *et al*, 2002; Leo & Schraven, 2002; Janssen and Zhang, 2003).

La capacidad de las proteínas mencionadas como reguladores negativos de la respuesta inmune ha sido demostrada en diversos modelos experimentales, principalmente ratones knock out (KO) en los que hay eliminación selectiva de uno o

más genes por recombinación homóloga. En los ratones KO analizados, la ausencia de uno o más de los genes correspondientes a proteínas de regulación negativa, mantiene a los linfocitos en un estado hiper-reactivo, dando lugar a diversos fenotipos de autoinmunidad. El efecto contrario se ha observado en ratones con hiperexpresión de algunas de estas moléculas, en los que los linfocitos no responden al estímulo antigénico y el animal presenta un fenotipo de inmunodeficiencia (Ravetch and Lanier, 2000; Leo *et al*, 2002; Leo & Schraven, 2002; Janssen and Zhang, 2003).

Como puede apreciarse, la regulación negativa mediada por dichas proteínas puede iniciarse y funcionar a diferentes niveles. Desde moléculas de superficie, como CTLA-4 que compite con el receptor CD28 por el ligando B7-1,-2, inhibiendo la señal coestimuladora, además de translucir señales negativas (Ravetch and Lanier, 2000). Fosfatasas, como SHP-1, que actúan sobre los mismos sustratos activados por las cinasas de la señalización positiva (Cornall *et al*, 1998). Cinasas que fosforilan el dominio inhibitorio de otra enzima, como Csk. Receptores con dominios ITIM intracelulares, como CD22 (Ravetch and Lanier, 2000). Ligasas de ubiquitina, como Cbl-b, que inducen la degradación de componentes de la cascada de señalización; e inclusive moléculas que modifican la forma y movilidad celular al interactuar con proteínas del citoesqueleto (Jang and Gu, 2003).

Dadas las características de las proteínas involucradas en los procesos de señalización de los linfocitos, es indispensable que a nivel intracelular exista una integración entre las señales positivas y las señales negativas, que asegure que la activación celular ocurra únicamente en el momento y lugar adecuado. La ausencia de uno u otro tipo de señales puede causar enfermedades por inmunodeficiencia o autoinmunidad (Billadeau and Leibson, 2002; Hermiston *et al*, 2002).

A continuación, se describen en detalle algunas moléculas que participan en la regulación de la activación celular, cuya ausencia o disfunción podría asociarse a fenotipos autoinmunes o de enfermedades inflamatorias crónicas o agudas.

Cbl-b o *Cas-Br-b*. Es una proteína de 982 aminoácidos (aa) que se expresa en células hematopoyéticas. Inicialmente identificada como parte de un retrovirus transformante que induce linfomas de células pre-B y pro-B en ratones. Contiene un dominio rico en prolina y un motivo de zipper de leucina. Interactúa con varias proteínas de transducción de señales, regulando su actividad. Por ejemplo, puede unirse directamente a proteína-quinasas como Vav, Lck, P13K, Fyn, Syk, LAT, ZAP-70 y PLC γ 1 disminuyendo su actividad, o mediante su actividad enzimática como ubiquitina E3 puede marcar dichas proteínas para su degradación alterando la cantidad disponible de estos componentes en la cadena de señalización (Jang and Gu, 2003). Al unirse e inhibir a Vav bloquea la señal de coestimulación mediada por CD28. Además, puede bloquear la vía de Ras secuestrando a la serina-treonina-quinasa Raf. En células B, disminuye la señal de activación compitiendo con PLC γ 2 por la unión a SLP-65 (Frauwirth and Thompson, 2002; Leo and Schraven, 2002). En ratones deficientes en Cbl-b, las células T pueden ser activadas y mantenerse así por largo tiempo, sólo por el reconocimiento antigénico y en ausencia de señales de coestimulación. Finalmente los ratones desarrollan varias enfermedades autoinmunes (Naramura *et al*, 2002,).

Csk o *C-Src tyrosine kinase*. Es una proteína citosólica de 450aa, de expresión ubicua y con actividad de tirosina-quinasa. Tiene dominios SH2 y SH3, que le permiten unirse y fosforilar cinasas de la familia Src en su extremo de regulación negativa carboxi-terminal, disminuyendo así su actividad enzimática. Se ha demostrado que el dominio SH2 le permite unirse a proteínas de la familia Dok, paxilina, tensina, Fak y a Cbp/PAG. Mediante el dominio SH3 se une de forma constitutiva a las fosfatasa PEP y PTP-PEST, que son proteínas que defosforilan la tirosina del dominio de activación de las Src cinasas, por lo que, actuando de forma sinérgica con Csk, inhiben su actividad (Hermiston *et al*, 2002). En células T no estimuladas se encuentra asociada a la proteína transmembranal fosforilada PAG, esta ubicación cercana a la membrana plasmática le permite inhibir a las cinasas de familia Src. Cuando la célula es estimulada, PAG es defosforilada liberando a Csk y permitiendo la activación de las cinasas (Leo *et al*, 2002). En células B se ha

encontrado que puede unirse a la proteína Dok-1 por lo que podría participar en la inhibición de la vía Ras-MAPK (Janssen and Zhang, 2003). En ratones que no expresan Csk se han observado niveles extremadamente altos de actividad de Src cinasas y los animales mueren a los 9 días en la etapa embrionaria (Imamoto and Soriano, 1993). Cuando se elimina la expresión de Csk en células T periféricas el ratón desarrolla un fenotipo de autoinmunidad (Hermiston *et al*, 2002).

PTP-PEST o *Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 12*. Es una proteína citosólica de 780aa, de expresión ubicua y con actividad de tirosina fosfatasa. Tiene una secuencia PEST carboxi-terminal que funciona como dominio de interacción entre proteínas, por lo que puede defosforilar varias proteínas de señalización, de citoesqueleto y de adhesión celular como Cas, Shc, Csk, Pyk2, Fak, CAK β /PTK2B y paxilina. Así, su efecto regulador sería inactivando la vía Ras y controlando la forma y movilidad de la célula. El ratón KO de esta proteína muere en etapa embrionaria (Angers-Loustau *et al*, 1999), pero su sobreexpresión muestra un efecto inhibitor en células B y T al actuar sobre las proteínas de señalización Shc, Pyk2, Fak y Cas (Davidson and Veillette, 2001).

SHP-2 o *Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 11*. Es una proteína-tirosina fosfatasa de 593aa, contiene dos dominios SH2 en tándem que le permiten unirse a fosfo-tirosinas (como Fyn, Lck, ZAP-70, SLP-76, LAT), a proteínas transmembranales con dominios ITIM (como SIT, SIRP1 α , PD-1), o a otros componentes celulares para modular su propia actividad de fosfatasa (Ravetch and Lanier, 2000; Leo and Schraven, 2002). También se ha observado que se une a la molécula transmembranal CTLA-4 por lo que podría participar defosforilando proteínas como LAT, Fyn, Lck, ZAP-70 y TCR ζ y contribuir al efecto inhibitor mediado por dicha molécula (Ravetch and Lanier, 2000, Lanier, 2001, Frauwirth and Thompson, 2002). Se ha observado que cuando se inhibe el reclutamiento de SHP-2 a la membrana celular, el linfocito permanece en un estado activado (Sayos *et al*, 1998).

SOCS-1 o *Supresor Of Cytokine Signaling 1*. Es una proteína con capacidad supresora de la señalización por citocinas, que a su vez es inducida por citocinas, es decir, actúa por retroregulación. Se expresa en todos los tejidos, en mayor cantidad en leucocitos, y puede ser inducida por citocinas como IL-2, IL-3, eritropoyetina e IFN γ . Tiene un dominio SH2 que le permite unirse a tirosina-quinasas JAK inhibiendo esta vía. También puede unirse a las cinasas Tec, Kit, Grb2 y Vav, y, mediante la llamada caja SOCS, al complejo elongina BC con lo que podría favorecer la ubiquitinación y degradación de las cinasas mencionadas (Krebs and Hilton, 2000). El ratón KO de SOCS-1 muere neonatalmente debido al efecto tóxico de hiperseñalización por IFN γ (Alexander *et al*, 1999). Cuando al ratón KO se le restaura la expresión de SOCS-1 en linfocitos B y T, sobrevive hasta 6 meses pero desarrolla un fenotipo de autoinmunidad muy similar al LES humano con producción de autoanticuerpos, lesiones en piel e hipergamaglobulinemia. Se sugiere que el desarrollo de autoinmunidad es debido a respuesta excesiva de células dendríticas a IFN γ e IL4, lo que lleva a producción de altos niveles de BAFF/BLyS y APRIL que son factores de crecimiento y diferenciación de linfocitos B, por lo que hay expansión aumentada de estas células y producción de anticuerpos autorreactivos (Hanada *et al*, 2003; Starr and Hilton, 2003). Además se ha encontrado que el ratón heterocigoto para SOCS-1, con expresión reducida del gen, presenta altos niveles de anticuerpos anti-DNA de doble cadena, lo que podría ser un factor de riesgo para la enfermedad (Hanada *et al*, 2003).

NFATc-1 o *Nuclear Factor of Activated T-cells Cytoplasmic, calcineurin-dependent 1*. Es una proteína de 943 aa que funciona como factor de transcripción. Se expresa en timo, bazo y en leucocitos periféricos. NFAT es un complejo que consiste de, al menos, dos componentes: un componente citosólico, altamente fosforilado, preexistente que se trasloca al núcleo después de ser desfosforilado por la calmodulina durante la activación y un componente nuclear inducible. Puede combinarse con homodímeros o heterodímeros de FOS y JUN (AP1) formando un complejo necesario para la transcripción de genes indispensables en la generación de una respuesta inmune productiva. Puede regular la activación, proliferación,

diferenciación y muerte programada de células T y otras células linfoides y no linfoides. La activación de NFATc-1, en ausencia del complejo AP-1, enciende genes asociados con anergia, lo que sugiere su participación en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. En ratones que no expresan NFATc-1 se ha encontrado hiperproliferación de células B y T y los linfocitos T son más resistentes a la inducción de anergia en experimentos *ex vivo* (Macián *et al*, 2002).

1.2. Autoinmunidad

La tolerancia inmunológica, la homeostasis celular y la regulación de la respuesta inmune mantienen a las células efectoras en un estado de reposo hasta que se presenta un estímulo antigénico externo, ante el cual son activadas para actuar única y exclusivamente contra el agente extraño. En ocasiones estos mecanismos fallan desencadenando fenómenos de autoinmunidad. En esto influyen factores genéticos y ambientales, los cuales interactúan para desencadenar la enfermedad (Hahn, 1997).

Dada la complejidad de las enfermedades autoinmunes, es difícil establecer la causa. Sin embargo, algunas observaciones permiten hacer consideraciones acerca de su etiopatogenia. Por ejemplo, algunas enfermedades autoinmunes se inician después de una infección aguda. Esto podría tener varias explicaciones no excluyentes. Tradicionalmente se ha pensado que el agente infeccioso puede inducir autoinmunidad cuando es procesado y presentado por CPA, activando linfocitos T que pueden reaccionar contra células que presenten el mismo MHC o el mismo antígeno. Otra explicación que se ha dado a esto es el llamado “mimetismo molecular” que implica reactividad cruzada entre antígenos del microorganismo y moléculas presentes en células no infectadas. También se ha sugerido que el microorganismo podría contener superantígenos que activarían linfocitos T en forma inespecífica, causando inflamación extrema y altos niveles de citocinas tóxicas (Gianani, 1996; Möller, 1998; Davidson and Diamond, 2001).

Sin embargo, a la luz de los conocimientos actuales de la inmunidad innata, es muy factible que una o más moléculas en los agentes infecciosos funcionen como activadores de la inmunidad innata a través de receptores tipo Toll u otros, activando la capacidad coestimuladora en las CPA, que en individuos con falla en cualquier mecanismo de homeostasis inmunológica fácilmente podría fácilmente disparar la actividad de clonas autorreactivas ignorantes de linfocitos T y B, eventualmente desencadenando una enfermedad autoinmune (Ohashi and DeFranco, 2002; Moreno, en prensa).

Una parte importante en la etiología de las enfermedades autoinmunes es la influencia genética, además de los polimorfismos o mutaciones de los genes que codifican proteínas que participan en la homeostasis inmunológica. Los polimorfismos más frecuentemente asociados a la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes están relacionados con el MHC, especialmente con alelos de moléculas clase II. Como se mencionó, las moléculas clases I y II del MHC presentan antígenos a los linfocitos T, por lo que la asociación con ciertos alelos del MHC implica una respuesta de linfocitos T específica. El hecho de que no todos los portadores de un alelo MHC ligado a enfermedad autoinmune la desarrollen, en individuos expuestos a un mismo sistema ambiental, necesariamente indica la existencia de otros genes de susceptibilidad, de los cuales los más probables son los que codifican proteínas importantes en procesos de inducción de tolerancia, homeostasis y regulación inmune (Todd *et al*, 1988).

En cuanto al tipo y extensión del daño que causan, las enfermedades autoinmunes se clasifican como:

- Órgano-específicas. Son enfermedades con daño limitado a un solo órgano o tejido, generalmente alterando su función. El daño puede ser mediado por autoanticuerpos, linfocitos T autorreactivos o ambos. Además de la autoinmunidad contra el tejido afectado, pueden estar presentes otros autoanticuerpos pero que no ocasionan daño, sino son marcadores serológicos de la enfermedad (Panayi, 1995; Janeway, 1999).

- Sistémicas o generalizadas. El daño ocurre en varios órganos o sistemas y puede ser directo o indirecto. Este último está mediado por complejos inmunes formados por autoanticuerpos y sus antígenos (como en el caso del LES). Los autoantígenos pueden pertenecer o no al tejido dañado pero en el caso del LES (con excepción de la anemia hemolítica y la púrpura trombocitopénica), los antígenos provienen de otros sitios y se depositan (como complejos inmunes) en los vasos de diversos tejidos, activando el sistema del complemento y desencadenando la cascada inflamatoria (Panayi, 1995; Janeway, 1999).

En las enfermedades autoinmunes el daño puede ser por anticuerpos que se unen a antígenos de superficie celular o matriz extracelular, por anticuerpos que se unen a antígenos solubles formando complejos inmunes o por linfocitos T colaboradores que activan células inflamatorias o actúan directamente sobre la célula blanco (Davidson and Diamond, 2001; Abbas, 2003).

1.2.1. Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es el prototipo de enfermedad autoinmune crónica y sistémica. Clínicamente se caracteriza por cursar con períodos de exacerbación y remisión (actividad e inactividad, respectivamente). Afecta predominantemente a mujeres en proporción 9:1 y la mayor incidencia ocurre entre los 15 y 44 años de edad (Kimberly, 2001; Wakeland, 2001).

El LES puede presentarse en una gran variedad de formas clínicas y sus signos y síntomas son muy diversos. Entre sus manifestaciones más frecuentes se encuentran: síntomas generales como fatiga, fiebre, pérdida de peso, eritema fotosensible en piel en forma de alas de mariposa (lo que le da el nombre a la enfermedad), artritis, serositis (pleuritis, pericarditis y peritonitis aséptica) vasculitis y glomerulonefritis. Además de anemia hemolítica, trombocitopenia, leucopenia, manifestaciones diversas en el sistema nervioso central, etc. El LES es una

enfermedad compleja y, muy probablemente, más que una enfermedad es un síndrome en el que un número, aún no determinado, de alteraciones diferentes pueden resultar en un cuadro clínico compatible con el espectro de manifestaciones clínicas atribuidas al LES (Kimberly, 2001; Abbas and Lichtman, 2003).

Existen además los denominados lupus inducidos por drogas que pueden ser el resultado de la administración de ciertos fármacos como la hidralazina, minociclina, procainamida, metildopa, quinidina y otras. Estos cuadros, que son muy parecidos al LES, generalmente son reversibles (con excepción de algunos casos inducidos por D-penicilamina) y no se asocian a daño visceral como ocurre en el LES idiopático, además de que los autoanticuerpos más característicos son los anticuerpos anti-histona. Los mecanismos por los cuales dichos medicamentos inducen la patología mencionada son desconocidos (Wakeland, 2001).

Los pacientes con LES producen diversos autoanticuerpos que pueden ser determinados en el suero, la mayoría de ellos se dirige contra moléculas intracelulares, tanto nucleares como citoplásmicas. Los más característicos son los anticuerpos anti-DNA, aunque también los hay contra ribonucleoproteínas, nucleosomas, histonas, antígenos nucleolares, ribosomas, etc. Con menor frecuencia se producen algunos autoanticuerpos contra antígenos de superficie celular, muy probablemente por que al estar expuestos tienen mayor capacidad de inducir tolerancia (Kotzin, 1996).

Los anticuerpos antinucleares (ANA) se presentan en aproximadamente 85% de los pacientes con LES. Sin embargo, su presencia no confirma el diagnóstico de LES ya que también se producen ANA en otras enfermedades del tejido conjuntivo. Así mismo, su ausencia no descarta LES, ya que algunos ANA requieren de técnicas especiales para su detección, las cuales no están disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos. De toda la gama de ANA, los anticuerpos anti-DNA de doble cadena (dsDNA) son los más característicos y probablemente los de mayor relevancia patogénica. Por otro lado, los anticuerpos contra la ribonucleoproteína

nuclear pequeña Sm son prácticamente exclusivos del LES, aunque son poco frecuentes (Kimberly, 2001; Talken *et al*, 2001).

El único grupo de anticuerpos dirigido contra moléculas intracelulares con posible implicación patogénica en el LES, son los anticuerpos dirigidos contra la ribonucleoproteína Ro/SSA. Estos anticuerpos, presentes en un subgrupo de LES denominado lupus cutáneo subagudo y en algunos pacientes con síndrome de Sjögren primario, cuando son transferidos por vía placentaria, producen en el recién nacido (y en el feto) el lupus neonatal, que es transitorio mientras persistan los anticuerpos maternos en la circulación, con excepción de algunos pacientes con lupus neonatal que cursan con bloqueo cardíaco congénito, que es permanente.

El tratamiento del LES es inespecífico y está dirigido a controlar la inflamación y la actividad inmunológica. Los medicamentos más efectivos son los esteroides, en ocasiones acompañados de drogas citotóxicas como metrotexate y ciclofosfamida y en casos leves hidroxicloroquina. Estos medicamentos pueden llegar a tener algún efecto benéfico en controlar la severidad de la enfermedad, pero generalmente hay efectos secundarios e incluso resistencia al fármaco, lo que disminuye notablemente la calidad de vida del paciente (Wakeland *et al*, 20001).

Se desconoce si el defecto patogénico primario en el LES es una falla en la tolerancia de linfocitos B o en la de linfocitos T colaboradores, o ambas. Tampoco se conoce el factor desencadenante de dicha falla. Como se mencionó, interactúan factores ambientales y genéticos que confieren susceptibilidad al padecimiento y que se manifiestan como alteraciones inmunológicas que llevan a la hiper-reactividad celular (Vyse and Todd, 1996; Gaffney *et al*, 1998).

Entre los factores ambientales asociados al LES, se han sugerido infecciones por virus como *Epstein Bar*, *Citomegalovirus* y *Poliomavirus*, aunque se ignora la forma en que lo hacen. Inicialmente, la infección por estos virus genera una respuesta inmune normal, pero posiblemente por reactividad cruzada o por posteriores

mutaciones somáticas en los genes de inmunoglobulina, pueden llevar a la producción de autoanticuerpos. Además, algunos inductores de apoptosis, como la luz ultravioleta o lesiones con alta tasa de muerte celular, liberan grandes cantidades de antígenos nucleares, algunos de los cuales podrían ser procesados por linfocitos B, presentados a linfocitos Th y causar la producción autoanticuerpos clase IgG contra DNA, histonas, nucleosomas y ribonucleoproteínas (Moens *et al*, 1995; James *et al*, 1997; Stratta, 1999).

Como factores genéticos de susceptibilidad al LES, por estudios de enlace, se ha encontrado que la enfermedad está relacionada con ciertos alelos del MHC, principalmente clase II. Así, los individuos con los alelos HLA-DR2 y HLA-DR3 tienen un riesgo 3 a 5 veces mayor de presentar la enfermedad, comparado con el resto de la población (Arnett, 1997; Harley *et al*, 1998; Tan and Arnett, 1998; Wakeland, 2001).

Los estudios realizados con células efectoras de la respuesta inmune de pacientes con LES, muestran que los linfocitos B y T CD4+ son hiper-reactivos, lo cual es compatible con los altos niveles séricos de autoanticuerpos en estos pacientes. De igual forma, los pacientes con LES aparentemente tienen deficiencias en la regulación de la respuesta inmune, lo cual se ha deducido del hecho de que la respuesta autorreactiva *in vivo* en pacientes con LES es prolongada y no cede a señales reguladoras o de muerte celular (Harley *et al*, 1998; Odendahl *et al*, 2000). También es común que los pacientes con LES tengan bajos niveles de componentes de la cascada del complemento, principalmente C1q, C2 y C4a, lo cual ha sugerido a algunos autores una posible incapacidad para eliminar complejos inmunes. De hecho, uno de los factores genéticos más fuertemente asociado al LES son los alelos cuya expresión de C2 y C4 es nula (Prodeus *et al*, 1998; Pickering and Walport, 2000).

Finalmente, dada la mayor susceptibilidad del sexo femenino para desarrollar LES y otras enfermedades autoinmunes, se ha sugerido que las hormonas

femeninas podrían participar en su patogenia, mientras que las hormonas masculinas podrían tener un efecto protector, aunque falta aún la prueba definitiva de ello y los mecanismos implicados son totalmente desconocidos (Walker, 1997; Cutolo *et al*, 1998).

Diversas evidencias indican que el daño principal en el LES es mediado por la respuesta autoinmune humoral. Aunque se ha asumido que los linfocitos T no tienen un papel directo en el daño tisular, evidencias indirectas sugieren fuertemente la participación de los linfocitos T colaboradores en la activación de los Infocitos B productores de autoanticuerpos, principalmente cuando son de la clase IgG, ya que el cambio de isotipo a IgG depende de la participación de linfocitos T colaboradores (Kotzin, 1996; Abbas and Lichtman, 2003). Así, se ha demostrado en modelos animales que la administración de anticuerpos anti-CD4 o de moléculas como CTLA-4 soluble, que interfieren con la interacción de linfocitos B-T, disminuyen la severidad de la enfermedad. Además, otros estudios más recientes sugieren que el daño intersticial en pacientes con la forma más grave de neuropatía lúpica (la glomerulonefritis proliferativa difusa tipo IV) es mediado por linfocitos T efectores infiltrantes (Thompson and Allison, 1997; Lee *et al*, 1998).

1.2.2. Estudios en modelos murinos

La mayoría de los estudios dirigidos a determinar la posible causa y mecanismos patogénicos del LES se han realizado en modelos animales. Principalmente en cepas de ratones que en forma espontánea desarrollan una enfermedad autoinmune parecida al LES humano.

Entre las cepas más estudiadas se encuentran:

- *NZWxNZB-F₁* y *NZWxSWR-F₁* (*New Zealand White / New Zealand Black / SWR*). Estos ratones híbridos tienen genes de susceptibilidad asociados al MHC y otros menos caracterizados, lo que contribuye al desarrollo de la

enfermedad. Los ratones de estas dos combinaciones tienen el cuadro más parecido al LES humano, con lesiones en riñón y anemia hemolítica, principalmente en las hembras. Serológicamente, producen autoanticuerpos anti-DNA en forma espontánea y hay hiperreactividad de linfocitos B y T inductores. Las dos cepas parentales contribuyen con distintos genes al fenómeno autoinmune de estos ratones híbridos. El ratón NZB cursa con autoinmunidad leve, especialmente anemia hemolítica, mientras que el NZW es sano, aunque tiene una delección que elimina varios segmentos V en la cadena α del TCR, aunque se ignora su contribución al fenómeno autoinmune (Theofilopoulos, 1985; Morel *et al*, 1994; Kono and Theofilopoulos, 1997; Vyse and Kotzin, 1998; Stoll and Gavalchin, 2000).

- *MRL*. Los ratones MRL tienen una enfermedad parecida al LES que es leve, de predominio en hembras y también asociada al MHC. Al cruzarlos con ratones con defectos genéticos en genes relacionados con la apoptosis (específicamente Fas y su ligando), el resultado es, en los homocigotos, una enfermedad autoinmune acelerada (de inicio más temprano) y grave, también más acentuada en las hembras. Estos ratones se designan como *lpr* (Fas) y *gld* (FasL).
- *MRL lpr/lpr*. Son ratones con el gen *fas* defectuoso debido a la inserción de un retrotransposón en un exón, lo que lleva a una transcripción anormal y baja expresión de la proteína. Los ratones homocigotos presentan deficiencias en la muerte celular apoptótica inducida por activación, lo que podría causar acumulación de linfocitos T CD4+ autorreactivos. Estos ratones producen múltiples autoanticuerpos, principalmente anti-DNA y anti-Sm, y desarrollan nefritis mediada por complejos inmunes. Además, los animales tienen crecimiento importante de órganos linfoides, debido a la acumulación de linfocitos por la ausencia del fenómeno apoptótico. También desarrollan artrosis autoinmune erosiva, similar a la artritis reumatoide, e infiltración de glándulas exócrinas, como el síndrome de Sjögren.
- *MRL gld/gld*. Estos ratones tienen una mutación puntual en el gene *fasL* por lo que no inducen apoptosis. Al igual que los ratones *lpr*, producen altos

niveles de autoanticuerpos y presentan nefritis mediada por complejos inmunes.

La introducción homocigota de los genes *lpr* y *gld* en ratones de otras cepas induce la acumulación de células linfoides en bazo y nódulos linfáticos y autoinmunidad leve, si acaso, lo que indica que los genes responsables de la autoinmunidad en el ratón MRL son distintos de los que la aceleran (como las mutaciones en Fas y su ligando o las hormonas sexuales femeninas) (Morel *et al*, 1994; Kono and Theofilopoulos, 1997; Vyse and Kotzin, 1998; Stoll and Gavalchin, 2000; Monneaux *et al*, 2001).

- *BxSB*. Esta es una cepa de ratones recombinante, en la cual la susceptibilidad a la enfermedad está ligada al cromosoma Y por lo que sólo los machos la desarrollan. Producen autoanticuerpos anti-DNA y presentan nefritis y vasculitis severas (Morel *et al*, 1994; Kono and Theofilopoulos, 1997; Vyse and Kotzin, 1998; Stoll and Gavalchin, 2000).

En todos estos modelos de ratones existen una o más mutaciones o alteraciones genéticas conocidas que les confiere mayor susceptibilidad a desarrollar autoinmunidad. Al igual que en los humanos, se desconoce el factor que desencadena el proceso patológico, ya que el defecto génico *per se* es insuficiente para que se desarrolle la enfermedad. Muchos de los genes implicados en la asociación a LES en estos ratones y en humanos son aún desconocidos y han sido localizados por genética clásica en ciertas regiones de diversos cromosomas. Con la secuenciación de los genomas humano y murino, es de esperarse que en un tiempo corto se conozcan dichos genes.

Dado el carácter autoinmune de la enfermedad, la hiper-reactividad de linfocitos B y T colaboradores, así como la deficiente “limpieza” de complejos inmunes que presentan los pacientes, se han estudiado principalmente genes relacionados con las siguientes funciones:

- * Tolerancia
- * Activación de linfocitos B y T
- * Regulación de la respuesta inmune
- * Limpieza de detritus celulares y depuración de complejos inmunes

En los estudios realizados en modelos murinos y en pacientes con LES, se ha encontrado que sus células inmunes, principalmente linfocitos y CPA, tienen mayor expresión de moléculas coestimuladoras como CD28, CD40, CD40L, B7-1, 2 y Bcl-2. Estas moléculas participan directamente en la activación y supervivencia de los linfocitos, por lo que podrían estar relacionadas con persistencia e hiper-reactividad de células B y Th, características de la enfermedad (Aringer *et al*, 1994; Rose *et al*, 1997; Devi *et al*, 1998; Abe *et al*, 1999; Kato *et al*, 1999; Liang *et al*, 1999; Bijl *et al*, 2001).

Así mismo, otras moléculas como Fas, FasL, TGF- β y CTLA-4 que participan en la eliminación y regulación negativa de la función de los linfocitos T y B, están disminuidas en pacientes o en modelos experimentales de LES (Liu *et al*, 1998; Ohtsuka *et al*, 1998). Igualmente, cuando se inhibe la expresión de moléculas cuya función es regresar a los linfocitos activados a su estado basal, como Gadd45, Cbl, PEP, PTP-PEST, SHIP, SHP-1 y SOCS-1, los linfocitos permanecen en un estado activado y los ratones desarrollan fenotipos diversos de autoinmunidad (Ono, 1997; Salvador *et al*, 2002).

Por otro lado, algunas citocinas que inducen respuesta inmune humoral, como IL-6 e IL-10, se encuentran en altos niveles en los pacientes con LES, mientras que citocinas que inducen respuesta celular, como la IL-12, se expresan en forma disminuida (Tan and Arnett, 1998; Dean *et al*, 2000; Tsai *et al*, 2000; Tsokos and Kammer, 2000).

Por otro lado, los componentes del complemento C1q, C2 y C4a y la DNAsa I se encuentran en bajos niveles en el suero de los pacientes con LES, lo que implica que los complejos inmunes formados, así como los restos celulares (incluyendo DNA y

complejos DNA/histona) de células muertas por apoptosis o necrosis, no son eliminados de forma apropiada. Esto ocasiona que los autoantígenos continúen activando células autorreactivas y, en consecuencia, aumenta el daño tisular (Prodeus *et al*, 1998; Pickering and Walport, 2000; Taylor *et al*, 2000; Walport, 2000). Un ejemplo de la importancia de la remoción de detritus en la susceptibilidad al LES es la proteína C reactiva (CRP). A diferencia de lo que ocurre en otras enfermedades inflamatorias, ya sea infecciosas o “endógenas”, en los pacientes con LES, aún en casos de actividad extrema, la CRP no se eleva, en ocasiones, ni siquiera cuando coexiste un proceso infeccioso. Esta proteína es muy importante en la remoción de células envejecidas y otros detritus celulares, las cuales podrían ser, por un lado, fuente de autoantígenos; y, por otro, fuente de moléculas endógenas capaces de activar la inmunidad innata, por lo tanto, aumentando la coestimulación.

El conjunto de lo anterior conduce a la falla en la regulación de la respuesta inmune, hiper-reactividad de linfocitos B y Th, que aunada a una limpieza ineficiente de complejos inmunes y restos celulares favorece, de una u otra forma, el desarrollo del LES. Aunque algunas de ellas podrían ser, más que causa, consecuencia del daño tisular, su presencia contribuye a magnificar el proceso de activación generalizada de la respuesta inmune.

2. Justificación

Los estudios en ratones muestran que la ausencia de expresión de genes implicados en la regulación de la activación de linfocitos T y B resulta en fenómenos de autoinmunidad, especialmente cuando se disminuye o elimina la expresión de genes que regulan negativamente el proceso de señalización que sigue al reconocimiento antigénico, como las proteínas Cbl-b, Csk, PTP-PEST, Shp-2 y SOCS-1. Sólo algunos de estos genes y de forma preliminar han sido estudiados en células linfoides de pacientes con enfermedades autoinmunes, por lo que es importante examinar el nivel de expresión de distintos genes inmunorreguladores en células linfoides de pacientes con lupus eritematoso sistémico para determinar si, al igual que en modelos murinos, la expresión deficiente de alguno de ellos se relaciona con la enfermedad y/o su grado de actividad.

3. Planteamiento del problema

Con base en lo anterior se plantearon las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es el perfil de expresión de genes inmunorreguladores en células linfoides de individuos sanos y de pacientes con LES inactivo?
2. ¿Cómo se modifica la expresión de genes inmunorreguladores en células linfoides durante la actividad del LES?

4. Hipótesis

1. Las células linfoides de pacientes con LES tienen expresión deficiente de algunos genes que codifican proteínas relacionadas con la regulación negativa de la respuesta inmune.
2. Las alteraciones en los genes inmunorreguladores en pacientes con LES están presentes independientemente de la actividad del padecimiento.

5. Objetivo general

Examinar el perfil de expresión de algunos genes implicados en la homeostasis intracelular en linfocitos de pacientes con LES inactivo o activo, comparada con individuos sanos.

6. Objetivos particulares

1. Establecer y comparar el perfil de expresión de genes inmunorreguladores en células linfoides de:
 - a) controles sanos vs pacientes con LES para identificar genes relacionados con la enfermedad
 - b) pacientes con LES inactivo vs pacientes con LES activo para identificar genes relacionados con la actividad de la enfermedad
2. Seleccionar genes de interés para su posterior caracterización funcional.

7. Materiales y métodos

Para el desarrollo de este trabajo se estudiaron células linfoides de tres grupos de personas, todas del sexo femenino: i) pacientes con LES inactivo, ii) pacientes con LES activo y iii) personas sanas. A cada paciente y control se le dio información detallada acerca del proyecto y sólo se incluyeron aquellos que aceptaron participar firmando una carta de consentimiento informado (Apéndice 2).

Criterios de inclusión.

- Diagnóstico de LES realizado por un reumatólogo considerando los criterios de clasificación clínicos y de laboratorio establecidos por el Colegio Americano de Reumatología en 1982 (Apéndice 1).
- Mujeres de 18 a 41 años de edad.
- Sin infecciones u otra patología adicional.
- Índice de actividad, mediante la escala del SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*, Apéndice 4), de 0-2 para las pacientes con lupus inactivo y de más de 2 para las pacientes con lupus activo.

Se excluyeron del estudio:

- Pacientes con infecciones o cualquier otra patología agregada que pudiese interferir con la interpretación de los resultados.

Controles. El grupo de controles estuvo conformado por mujeres de 18 a 40 años, sanas, sin infecciones y sin antecedentes familiares de lupus.

Obtención de sangre periférica. A cada paciente y control se le extrajeron 40 ml de sangre periférica mediante punción venosa con una mariposa para venocclisis. La sangre fue mezclada inmediatamente con el anticoagulante heparina de 1000 unidades, en proporción 1:10 y mantenida a temperatura ambiente (TA) para su posterior procesamiento.

Separación de células mononucleares. Para separar las células mononucleares (CMN), la sangre con anticoagulante fue diluida en proporción 1:3 con amortiguador de sales de fosfato (PBS: 15 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), pH 7.4, estéril. 35 ml de sangre diluida se colocaron sobre 12 ml de gradiente de Ficoll-Hypaque en tubos de 50 ml, se centrifugó a 1,500 rpm durante 30 min a TA. Se recuperó el anillo blanco de CMN ubicado en la interfase, entre el ficoll y el suero, se colocó en un nuevo tubo de 50 ml y se lavó 4 veces con 50 ml de PBS. Los primeros 3 lavados se realizaron a 1,200 rpm durante 8 min a TA, el último lavado se realizó a 900 rpm durante 15 min. Finalmente las CMN se resuspendieron en 10 ml de medio RPMI (Gibco BRL) sin suero y se determinó la densidad celular en una cámara de NeuBauer, tiñendo con azul tripano.

Tratamiento de las células mononucleares con metil-éster de leucina. Se ajustó la densidad celular a 5×10^6 células por ml, se mezclaron con 5 mM metil-éster de leucina fresco y se incubaron durante 40 min a TA. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 1,200 rpm durante 8 min y posteriormente se lavaron tres veces con 50 ml de PBS a 1,200 rpm durante 8 min a TA. El botón final se resuspendió en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino descomplementado (30 min a 56° C), 0.5 mM glutamina, 1% aminoácidos no esenciales (Gibco BRL), 1% piruvato de sodio, 2-mercapto etanol (Sigma) y antibióticos (gentamicina y ciproxina). Finalmente, se determinó la densidad celular en cámara de NeuBauer.

Activación de células linfoides con ionomicina/forbol-acetato miristato (PMA). Se estimularon 2×10^5 células linfoides/pozo en placas de 12 pozos con 1.4 μ M ionomicina (Boehringer Mannheim) y 10 ng/ml PMA (Sigma), durante 24 h a 37° C. Posteriormente, se recuperaron las células y mediante citometría de flujo se determinó la eficiencia de la estimulación tomando muestras al azar.

Citometría de flujo. Se tomaron 150,000 células y se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 unido a isotiocianato de fluoresceína (Dako) y anti-CD69 unido a ficoeritrina. Las células se centrifugaron a 1,500 rpm durante 3 min a 4° C, se incubaron con el anticuerpo correspondiente en PBS/5 mM EDTA suplementado con

2% suero de conejo y 0.1% azida de sodio, se incubaron durante 20 min a 4° C en oscuridad y se lavaron tres veces con PBS/5 mM EDTA/2% suero de conejo/0.1% azida. Finalmente se resuspendieron en 400 µl del mismo amortiguador y se analizaron en un citómetro de flujo usando el software para uno o dos colores (FACSort, Becton Dickinson).

Extracción de RNA mensajero de células linfoides no activadas y activadas con ionomicina/PMA. Se recuperaron las células no activadas y activadas, se lavaron con solución salina y se extrajo el RNA mensajero (RNAm) empleando el kit de purificación Direct mRNA Purification Kit (Qiagen). Las células se resuspendieron en solución de lisis (isotiocianato de guanidina), se precipitaron proteínas con el buffer ODB y se centrifugó durante 3 min a 18,000 g. Se recuperó el sobrenadante y se añadieron 30 µl de oligotex® (10% partículas de oligotex en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% NaN₃), se centrifugó durante 5 min a 18,000 g, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en buffer OW1. Se transfirió a una columna y se realizaron dos lavados con buffer OW2 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) centrifugando durante 1 min a 18,000 g. Se eluyó el RNAm con 30 µl de agua libre de nucleasas a 70° C y centrifugando 1 min a 16,000g.

Síntesis de cDNA. Con 1 µl de RNA mensajero se sintetizó el cDNA correspondiente a cada muestra. Se empleó 1 µl de 0.5 µg/µl oligo dT, 1 µl de 10 mM mezcla de dNTP's (10 mM dATP, dCTP dGTP, dTTP, cada uno), 2 µl de buffer de reacción (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 4 µl de 25 mM MgCl₂, 2 µl de 0.1 M DTT, 1 µl de 40 U/µl inhibidor de RNAsas y 1 µl de 50 U/µl retrotranscriptasa SuperScript II. La reacción se llevó a cabo durante 50 min a 42° C.

Diseño de iniciadores LUX (*Light Upon eXtensión*) para reacciones de PCR. Para cada gen se diseñaron dos secuencias, una marcada con un fluoróforo y otra sin marcar, con el programa de cómputo LUX (www.invitrogen.com/LUX), Tabla 1. Se eligieron secuencias con temperaturas de alineación de 55° C y tamaño de los productos de PCR cercanos a 100 pb, para realizar las reacciones en condiciones

comparables. Para los genes HPRT y β -actina, se adquirieron iniciadores prediseñados por la casa comercial, tomando en cuenta la temperatura de alineación y el tamaño del producto de la reacción. Para los genes Cbl-b, Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1, NFATc-1 e IL-2, el fluoróforo fue FAM (carboxi-fluoresceína), mientras que para HPRT y β -actina se empleó el fluoróforo JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína).

Tabla 1. Iniciadores LUX.

Nombre	Secuencia	Tipo	Orientación	Longitud	Producto (pb)
Cbl-1	cacagcCGGAATTGGAATTTCTTAGCTGtG	marcado	sentido	30	
Cbl-2	GCTTCCGGGTTTGGTGCTAT	no marcado	antisentido	20	104
Csk-1	gaactcGCGGCCAGGATGAGtC	marcado	sentido	24	
Csk-2	CCCTTCCCgATGGTCTGC	no marcado	antisentido	18	79
IL2-1	caccagACTTAAATGTGAGCATCCTGGtG	marcado	antisentido	29	
IL2-2	TGGAGCATTACTGCTGGATTT	no marcado	sentido	22	89
NFAT-1	cacgaACCAGCTCGGCCATCGtG	marcado	sentido	23	
NFAT-2	GGTGGTCTTGCGGGACTTG	no marcado	antisentido	19	95
PEST-1	caacaaACCCGCAGTTGCCTTgTg	marcado	sentido	25	
PEST-2	GGGTGGCACTGGATGAGGTT	no marcado	antisentido	20	74
SHP-1	gactgcTTGGGAACGTCAATATCGCAGtC	marcado	antisentido	29	
SHP-2	GGACAGGGACGTTcATTGTGA	no marcado	sentido	21	81
SOCS-1	cacggAGCATTAACTGGGATGCCGtG	marcado	sentido	26	
SOCS-2	CATCCGCTCCCTCCAACC	no marcado	antisentido	18	88

La cuantificación de genes mediante reacciones de PCR en tiempo real empleando el sistema de iniciadores LUX (*Light Upon eXtensión*), requiere un iniciador no marcado y un iniciador marcado con un fluoróforo unido a su extremo 3'. Además, el iniciador marcado tiene en su extremo 5', una secuencia de 4-6 nucleótidos que es complementaria al extremo 3'. Debido a esta complementariedad, el iniciador marcado adopta una estructura secundaria en forma de asa, que disminuye la fluorescencia del marcador. Cuando el iniciador es incorporado en un producto de PCR de doble cadena, el fluoróforo es expuesto y la señal que emite se incrementa hasta 10 veces.

Ensayos cualitativos y cuantitativos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A partir de 1 μ l de cada cDNA se realizaron reacciones de PCR de los genes Cbl-b, Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS1, NFATc-1, IL-2, HPRT y β -actina, con el sistema de iniciadores LUX (InVitrogen). Se emplearon 0.5 μ l de 10 μ M iniciador marcado, 0.5 μ l de 10 μ M iniciador sin marcar, 15 μ l de 2X Platinum QPCR Master Mix-UDG (60 U/ml enzima *platinum* Taq DNA polimerasa, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 100 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 400 mM dATP, 400 mM dCTP 400 mM dGTP, 400 mM dUTP, 40 U/ml UDG), 12.5 μ l de agua estéril y 0.5 μ l del fluoróforo ROX (carboxi-X-rodamina) como referencia pasiva. Se realizaron reacciones cualitativas de PCR, para determinar la eficacia y especificidad de los iniciadores diseñados, en el equipo GeneAmp PCR System 9700 de Perkin Elmer, con las condiciones de amplificación siguientes: activación de la enzima con una preincubación de 50° C/2 min, 95° C/2 min y 35 ciclos de 95° C/15 seg, 55° C/30 seg y 72° C/30 seg. Las reacciones de PCR cuantitativas en tiempo real se realizaron en el equipo ABI Prism 7000 de Applied Biosystem, con las mismas condiciones de amplificación y una corrida de disociación que consistió en un aumento gradual de temperatura de 60° a 99° C. La corrida de disociación es otra forma de comprobar la especificidad de cada par de iniciadores empleado para la reacción. Como resultado de la disociación se obtiene una gráfica de unidades de fluorescencia con respecto a la temperatura, cuando la amplificación es específica se observa un pico bien definido en la temperatura a la cual el 50% del producto de PCR se encuentra en la forma de DNA de doble cadena.

Electroforesis en geles de agarosa. Muestras de 10 μ l de cada producto de PCR cualitativo, así como muestras aleatorias de los productos de PCR cuantitativo, fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa (Seakem) al 2% adicionado con bromuro de etidio. El corrimiento fue a 85 Volts durante 90 min en buffer TAE (40 mM Tris-Acetato, 2 mM Na₂EDTA). La visualización de las bandas correspondientes a los productos de PCR se realizó exponiendo el gel en una cámara de luz ultravioleta (MacroVue UV-20, Hoefer), que induce la fluorescencia del

bromuro de etidio sólo cuando éste se encuentra intercalado en una secuencia de DNA de doble cadena.

Clonación del fragmento de 540 pares de bases del gen β -actina humano en el vector *pCR-Blunt II TOPO*. Se clonó un fragmento de 540 del gen β -actina humano siguiendo el procedimiento indicado en el manual del Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit. El kit contiene el vector *pCR-Blunt II TOPO* vector linealizado por acción de la DNA topoisomerasa I unida covalentemente a su extremo 3'. La topoisomerasa I se une al DNA blanco de doble cadena, reconoce una secuencia CCCTT y rompe el enlace fosfodiéster de una de las cadenas en el extremo 5' de dicha secuencia. La energía liberada es conservada mediante la formación de un enlace covalente entre el fosfato del extremo 3' de la cadena cortada y un residuo de tirosina de la enzima. El enlace formado entre el DNA y la enzima puede ser atacado por el hidroxilo 5' de la cadena cortada inicialmente, incorporando la secuencia de interés y liberando la topoisomerasa. 4 μ l del fragmento de β -actina, producidos mediante PCR, fueron mezclados con 1 μ l de solución de sales (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂) y 1 μ l de 10 ng/ μ l vector *pCR-Blunt II TOPO* (disuelto en una solución de 50% glicerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 30 μ M azul de bromofenol, 0.1% triton X-100, 100 μ g/ml BSA). Se agitó suavemente y se incubó durante 30 min a TA para permitir que actuara la topoisomerasa I. Con 4 μ l de esta reacción, se transformaron bacterias *Escherichia coli* químicamente competentes (cepa TOP10) incubando en hielo durante 30 min, seguido de un choque térmico de 45 seg 42° C. Se adicionaron 250 μ l de medio SOC (2% trisona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa) y se incubó a 200 rpm/37° C /2 h. 100 μ l de la suspensión de bacterias transformadas se sembraron en una placa selectiva de medio Luria-Betani (LB, 1.0% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1.0% NaCl, pH 7.4), adicionado con 50 μ g/ml de Kanamicina, y se incubaron toda la noche a 37° C. Se verificó por PCR la incorporación del inserto de 540 pb del gen de β -actina.

Purificación del DNA plasmídico. Bacterias *E. coli* transformadas se sembraron en 3 ml de medio LB adicionado con el antibiótico kanamicina, se incubaron toda la noche a 37° C y 250 rpm. Posterior a la incubación, se centrifugaron a 10,000 g durante 2 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón bacteriano en 200µl de solución para células (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA). Se adicionaron 200 µl de solución de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS) y 200 µl de solución neutralizadora(3.0 M acetato de potasio, pH 5.5), se mezcló por inversión y se centrifugó a 10,000xg durante 5 min. Se depositó el sobrenadante sobre 1 ml de resina contenida en una minicolumna ensamblada a un sistema de vacío, accionando el vacío se hizo pasar el sobrenadante a través de la columna. Aplicando el mismo sistema se lavó con 2 ml de solución de lavado (750 mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol) y se dejó secar la columna al vacío durante 30 seg más. Se pasó la columna a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se centrifugó a 10,000 g durante 2 min. En un tubo nuevo, se le adicionaron 50 µl de agua estéril libre de nucleasas y se centrifugó a 10,000 g durante 20 seg para eluir el DNA.

Curva estándar de concentración de b-actina. Se realizó una curva estándar de concentración, con diluciones decimales hechas a partir de una concentración conocida del plásmido clonado con un fragmento del gen β -actina humano. Dicho plásmido fue empleado como molde para realizar reacciones de PCR cuantitativas, en las condiciones previamente descritas. Los datos obtenidos fueron graficados y mediante regresión lineal se obtuvo la ecuación con la cual se determinó la concentración de RNAm de cada gen en estudio.

Análisis estadístico. Para cada gen se determinó la distribución de los resultados obtenidos mediante histogramas de expresión relativa vs número de muestra. Los datos mostraron una distribución no homogénea (no paramétrica), por lo que se emplearon las pruebas estadísticas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, para determinar si eran significativas las diferencias observadas en los niveles de expresión génica entre los tres grupos. En ambas pruebas se consideró como diferencia significativa un valor de $p < 0.05$. La prueba de Kruskal-

Wallis se usa para comparar diferentes grupos, de n número de muestras cada uno, con una variable dependiente en común. La prueba de Mann-Whitney es similar a la anterior pero sólo se comparan dos grupos a la vez. Se usó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los tres grupos entre sí: control (n=5), pacientes con LES inactivo (n=7) y pacientes con LES activo (n=10); la variable dependiente fue el nivel de expresión de cada gen. Posteriormente, empleando la prueba de Mann-Whitney se compararon los grupos por pares: controles vs pacientes con LES inactivo, controles vs pacientes con LES activo y pacientes con LES inactivo vs pacientes con LES activo. Por ser más específica, se consideraron, y reportaron, los valores de p obtenidos con la prueba de Mann-Whitney.

8. Resultados

En este trabajo se incluyeron 7 pacientes consecutivas con lupus inactivo y 10 pacientes con lupus activo, todas fueron mujeres entre 18 y 41 años de edad. Las pacientes fueron diagnosticadas por un reumatólogo, tomando en cuenta los criterios de clasificación establecidos por el Colegio Americano de Reumatología en 1982 (entonces Asociación Americana de Reumatismo, Apéndice 1). Todas firmaron la carta de consentimiento informado (Apéndice 2), aceptando participar en el estudio. Se llenó un cuestionario clínico pre-establecido (Apéndice 3) y se revisó el historial clínico para determinar la antigüedad y evolución de la enfermedad, así como los medicamentos suministrados a la paciente para su control. En todas las pacientes se registraron las manifestaciones clínicas presentes al momento de tomar la muestra, para determinar el índice de actividad con base en la escala SLEDAI (Apéndice 4), que asigna puntos a cada signo, síntoma o variable de laboratorio de acuerdo a la supuesta gravedad de cada una de las variables examinadas por medio de una escala diseñada por un consenso de expertos. La escala es progresiva del 0 al 14 y, aunque sólo puede considerarse como inactividad absoluta una calificación de "0", aquí consideramos como inactivas a las pacientes con una calificación de 2 o menos, y activas a todas aquéllas con calificación por arriba de 2. Como controles, se incluyeron 5 mujeres sanas sin antecedentes familiares de LES u otra enfermedad autoinmune, con edades similares a las de las pacientes. Ninguna de las mujeres incluidas en el estudio (pacientes o controles) presentaba infecciones u otra patología adicional al momento de tomar la muestra (Tabla 2).

Para considerar a una paciente como inactiva, se tomó una calificación ≤ 2 debido a que clínicamente no presentaron manifestaciones de actividad, aunque por laboratorio había hipocomplementemia o anticuerpos anti-DNA (puntuación=2), por lo que a criterio y experiencia del reumatólogo tratante estaban inactivas.

Tabla 2. Características de las mujeres incluidas en el estudio.

CLAVE	GRUPO	EDAD (años)	Índice de Actividad	TIEMPO DE EVOL (años)	TRATAMIENTO (mg)
7	Control	20	NA	NA	NA
10	Control	21	NA	NA	NA
38	Control	35	NA	NA	NA
40	Control	35	NA	NA	NA
45	Control	20	NA	NA	NA
4	Lupus inactivo	20	2*	5	PDN 5, CLQ 5
9	Lupus inactivo	38	0	2	PDN 20, CspA 125
23	Lupus inactivo	24	2*	4	PDN 7.5, AZA 75
30	Lupus inactivo	30	2*	12	PDN 10
31	Lupus inactivo	21	0	12	PDN 10, AZA 75, ALEN 70
35	Lupus inactivo	28	2*	13	PDN 10
36	Lupus inactivo	17	0	9	PDN 10, CLQ 150, AZA 100
2	Lupus activo	21	6	3	PDN 15, CLQ 150, AZA 100
3	Lupus activo	21	6	1	PDN 20, CFA 1,200
19	Lupus activo	35	12	2	PDN 10, CLQ 5
20	Lupus activo	25	11	2	PDN 15, AZA 125
24	Lupus activo	24	9	0	PDN 25, CLQ, AZA
27	Lupus activo	19	8	2	PDN 10, MFO 500
32	Lupus activo	21	8	8	PDN 5, CLQ, AZA
47	Lupus activo	21	10	0	PDN 60, CFA 800
48	Lupus activo	25	10	7	CLQ
50	Lupus activo	2	8	1	PDN 50, CLQ

NA = No aplica

2* Clínicamente inactiva pero con datos de hipocomplementemia o anticuerpos anti-DNA.

Se obtuvieron células mononucleares (CMN) de sangre periférica por punción venosa y gradiente de Ficoll-Hypaque. Las CMN se trataron con metil-ester de leucina, que elimina monocitos y otras células con capacidad citotóxica como células NK y linfocitos T CD8+, por lo que la población restante contiene primordialmente linfocitos B y linfocitos T CD4⁺. Estas células se utilizaron activadas o no con ionomicina/PMA durante 24 h, después de lo cual se tomó una alícuota en la que se examinó el nivel de activación de los linfocitos por citometría de flujo al teñir las CMN con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD69. La primera es una molécula específica de linfocitos T colaboradores y la segunda es un marcador de activación celular. Así, la expresión de CD69 por las células CD4⁺ es indicativa de su activación, mientras que la expresión del mismo marcador por células CD4⁻, indica, esencialmente, activación de linfocitos B. La figura 2 muestra un aumento claro de la expresión de CD69 tanto

por células CD4- (linfocitos B), como CD4+ (linfocitos T colaboradores), demostrando que nuestro sistema de activación celular funciona adecuadamente para ambas poblaciones.

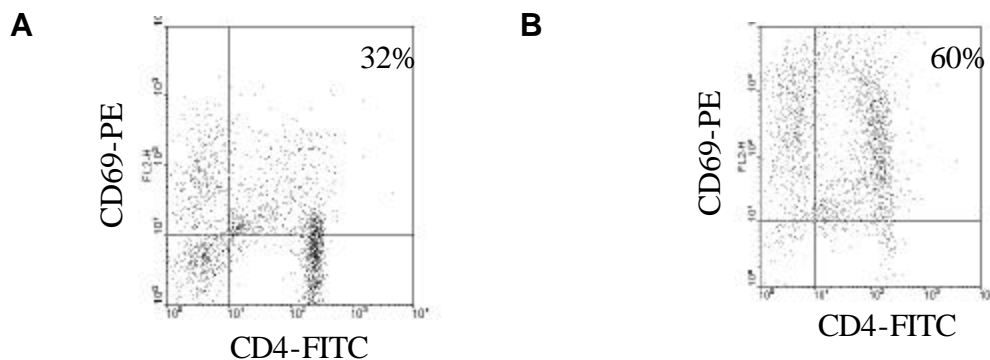


Figura 2. La combinación ionomicina/PMA induce activación de linfocitos T y B a las 24 h. (A) Células linfoides no activadas o (B) activadas con ionomicina (1.4 μ M) y PMA (10 ng/m) durante 24 h a 37^o C, después de lo cual se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD4-FITC y anti-CD69-PE y se analizaron por citometría de flujo de dos colores para determinar el porcentaje de activación.

Además de la expresión de CD69, otra forma de estimar la activación celular es mediante apreciación visual. Al activarse, las células, además de cambiar su morfología, expresan moléculas de adhesión intercelular, lo que provoca la formación de conglomerados (racimos) celulares que pueden observarse al microscopio. Así, la tinción celular para CD4 y CD69 sólo se realizó en los primeros ensayos. Una vez demostrado que la expresión de CD69 correlacionaba con la formación de conglomerados celulares, en las demás pacientes y controles, sólo se utilizó este último parámetro como indicador de activación.

Después de 24 h de cultivo en ausencia o presencia de ionomicina/PMA, no activadas o activadas, respectivamente, se recuperaron las células, se lavaron con solución salina y se extrajo el RNA mensajero (poliA), a partir del cual se sintetizó el cDNA. Con éste se realizaron los ensayos cualitativos y cuantitativos de PCR para determinar la expresión de los genes que codifican Cbl-b, Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1, NFATc-1, y como controles de activación y de expresión constitutiva IL-2 y HPRT y β -actina, respectivamente.

Aunque en cada caso se obtuvieron células linfoides no activadas y activadas, el número final de células de cada población fue bajo (1×10^6 células en promedio), por lo que en algunos casos no fue posible obtener suficiente RNA mensajero al final de la extracción, sobre todo en las pacientes activas que con frecuencia cursan con linfopenia. La Tabla 3 muestra las pacientes de las que se obtuvo suficiente RNAm, para análisis estadístico, las muestras se dividieron en células no activadas y activadas. Así, se incluyeron para su estudio las siguientes células: control no activadas (n=5), control activadas (n=5), LES inactivo no activadas (n=6), LES inactivo activadas (n=7), LES activo no activadas (n=7) y LES activo activadas (n=10), para un total de 40 muestras, en las que se determinó el nivel de expresión de Cbl-b, Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1, NFATc-1, IL-2, HPRT y β -actina.

Tabla 3. Pacientes y controles incluidos en el estudio.

CLAVE *	GRUPO	CÉLULAS	CLAVE*	GRUPO	CÉLULAS
7NA	Sano	No activadas	7A	Sano	Activadas
8NA	Sano	No activadas	10A	Sano	Activadas
10NA	Sano	No activadas	38A	Sano	Activadas
29NA	Sano	No activadas	43A	Sano	Activadas
40NA	Sano	No activadas	45A	Sano	Activadas
4NA	Lupus inactivo	No activadas	4A	Lupus inactivo	Activadas
9NA	Lupus inactivo	No activadas	9A	Lupus inactivo	Activadas
22NA	Lupus inactivo	No activadas	23A	Lupus inactivo	Activadas
30NA	Lupus inactivo	No activadas	30A	Lupus inactivo	Activadas
31NA	Lupus inactivo	No activadas	31A	Lupus inactivo	Activadas
36NA	Lupus inactivo	No activadas	35A	Lupus inactivo	Activadas
			36A	Lupus inactivo	Activadas
2NA	Lupus activo	No activadas	2A	Lupus activo	Activadas
18NA	Lupus activo	No activadas	3A	Lupus activo	Activadas
20NA	Lupus activo	No activadas	19A	Lupus activo	Activadas
24NA	Lupus activo	No activadas	20A	Lupus activo	Activadas
27NA	Lupus activo	No activadas	24A	Lupus activo	Activadas
32NA	Lupus activo	No activadas	27A	Lupus activo	Activadas
47NA	Lupus activo	No activadas	32A	Lupus activo	Activadas
			47A	Lupus activo	Activadas
			48A	Lupus activo	Activadas
			50A	Lupus activo	Activadas

* La clave indica el número de paciente o control y el tipo de células (no activadas NA, o activadas A).

Se diseñaron dos secuencias para cada uno de los genes Cbl-b, Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1, NFATc-1 e IL-2, una marcada con un fluoróforo y otra sin marcar, con temperaturas de alineación de 55° C y tamaños de los productos de PCR similares (100 pb). Para determinar la especificidad de cada par de iniciadores, se realizaron ensayos cualitativos de PCR durante 35 ciclos, con 1 µl del cDNA de CMN activadas de un individuo sano. El producto de reacción se corrió en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Como puede verse en la Figura 3, las reacciones de PCR son específicas ya que amplificaron una sola banda. Así, se consideraron útiles para los ensayos cuantitativos. En cuanto a los genes HPRT y β -actina, el segundo fue un control más estable para cuantificar y normalizar los niveles de expresión de los demás genes, ya que sus niveles de expresión eran muy similares en los tres grupos.

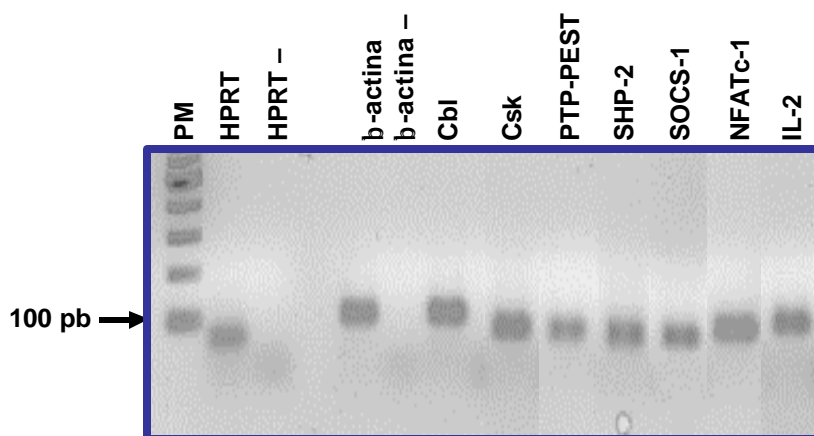


Figura 3. Especificidad de las reacciones de PCR. Se realizaron ensayos cualitativos de PCR (35 ciclos) para los genes HPRT, β -actina, Cbl-b, Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1, NFATc-1 e IL-2 a partir de 1µl de cDNA de células activadas de un control sano. Los productos de la PCR se evaluaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. **M-** Marcadores de tamaño molecular en pares de bases.

Paralelamente, se clonó un fragmento de 540pb del gen de β -actina humana en el vector *“pCR-Blunt II TOPO”* (Invitrogen). El producto clonado se transformó en *E. coli*. Mediante PCR se seleccionaron 4 colonias positivas que contenían el fragmento (Figura 4). Se eligió una de las colonias, se extrajo el DNA plasmídico y se evaluó la concentración por densitometría con el programa KODAK 1D 3.5. Considerando el factor de dilución, la concentración final obtenida fue de 0.4546 µg/µl.

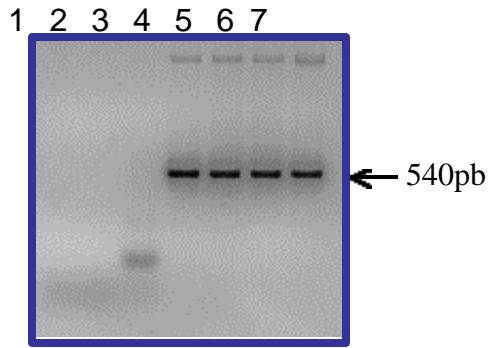


Figura 4. Clonación del fragmento de 540pb del gen b-actina humana. El fragmento de 540 pb del gen de β-actina humana se clonó en el vector “*pCR-Blunt II TOPO*” siguiendo el protocolo de ligación recomendado por el fabricante. Mediante una reacción de PCR se comprobó que el vector contuviera el fragmento, obteniéndose la banda esperada a 540pb al correr el producto de la PCR en un gel de agarosa al 2%. Carriles: **1** Control negativo sin DNA molde, **2** Control negativo del vector no clonado, **3** Control positivo con los iniciadores LUX de β-actina, **4, 5, 6 y 7** Amplificación de β-actina de las clonas positivas.

Para calcular el número de moléculas del plásmido, y por lo tanto del fragmento de β-actina clonado, se partió de la concentración determinada por densitometría y del tamaño del plásmido ya clonado aplicando los siguientes cálculos:

$$\text{Tamaño total del plásmido clonado} = 4059\text{pb}$$

$$\text{Concentración final del plásmido clonado} = 0.4546 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$\text{pmol} = \frac{X \mu\text{g} \times 10^6 \text{pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{pmol}}{660 \text{pg}} \times \frac{1}{\# \text{pb}}$$

$$\text{pmol} = \frac{(0.4546 \mu\text{g})(10^6)}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{pmol}}{660 \text{pg}} \times \frac{1}{4059 \text{pb}}$$

$$\text{pmol} = 1.697$$

$$1 \text{ pmol} = 10^{-12} \text{ mol} = 6.022 \times 10^{11} \text{ moléculas}$$

Por lo tanto:

$$1 \text{ pmol} = 6.022 \times 10^{11} \text{ moléculas}$$

$$1.697 \text{ pmol} = X \text{ moléculas}$$

$$X = 1.0219 \times 10^{12} \text{ moléculas}$$

La concentración del plásmido clonado (0.4546 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) corresponde a 1.0219×10^{12} moléculas/ μl del vector y, por lo tanto, del gen clonado, puesto que cada vector contiene una sola copia del gen β -actina. De acuerdo a la concentración del vector clonado, se hicieron diluciones seriadas para obtener la curva estándar de concentración con la cual se calculó el número de copias de RNAm de cada gen estudiado. Las diluciones y el número de moléculas correspondiente a cada una se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Curva estándar de concentración del plásmido *pCR-Blunt II TOPO* clonado con el fragmento de 540 pb del gen β -actina humano.

Dilución	1:2	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
Número de moléculas/ml	5.11×10^{11}	5.11×10^{10}	5.11×10^9	5.11×10^8	5.11×10^7	5.11×10^6	5.11×10^5

Con $1\mu\text{l}$ de cada una de las últimas 4 diluciones se hicieron reacciones de PCR en tiempo real durante 45 ciclos empleando los iniciadores LUX para β -actina. Como resultado del ensayo se obtuvo la gráfica de la Figura 5, donde se muestra un ejemplo de las curvas reportadas por el equipo al final de una corrida de 45 ciclos. En el eje de las X está el número de ciclos y en el eje de las Y, las unidades de fluorescencia correspondientes a cada ciclo. Para construir este tipo de curva, el valor de Y se normaliza dividiéndolo entre la fluorescencia basal determinada de acuerdo a la referencia pasiva ROX. Como este fluoróforo no está incorporado a un iniciador, su intensidad se mantiene constante a lo largo de la corrida y permite eliminar el error humano al momento de pipetear, de esta forma se consideran homogéneas las cantidades empleadas para la reacción. Una vez que dicho valor fue normalizado, se le restó la señal reportada en los primeros ciclos de la corrida (generalmente del 1o al 13o ciclos), en los que aún no se detecta un aumento en la fluorescencia resultante de la amplificación. Los datos obtenidos después de efectuar estas correcciones matemáticas se consideran unidades de fluorescencia y son los que se emplean para construir curvas como las de la Figura 5.

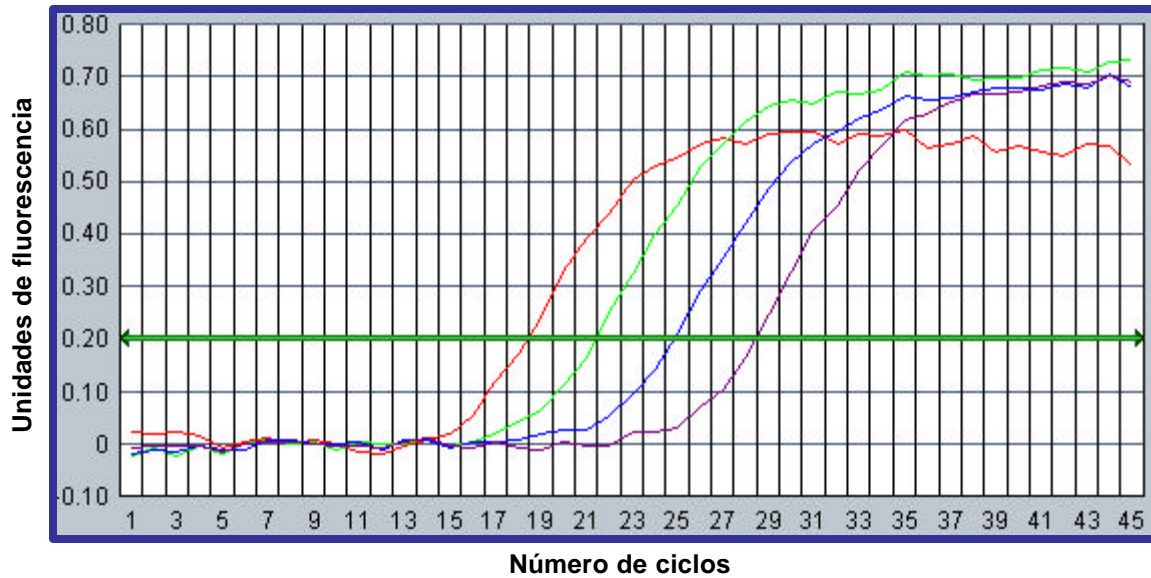


Figura 5. Curva estándar de concentración de b-actina. Muestras de 1 μ l de diluciones decimales hechas a partir de una concentración conocida del vector *pCR-Blunt II TOPO* con el gen β -actina humano, se amplificaron durante 45 ciclos con el sistema Platinum Quantitative PCR-LUX, en el termociclador ABIPrism 7000. La gráfica muestra las curvas de las unidades de fluorescencia con respecto al número de ciclos. Rojo = 5.11×10^8 moléculas, verde = 5.11×10^7 moléculas, azul = 5.11×10^6 moléculas, morado = 5.11×10^5 moléculas.

Los estudios de PCR cuantitativa en tiempo real deben utilizar datos obtenidos durante la fase exponencial de la reacción (zona ascendente de la curva, Figura 5), cuando cada ciclo duplica el número de copias del DNA molde, detectado como aumentos lineales en unidades de fluorescencia. La figura 5 muestra que durante los ciclos 1-13 y 40-45 la fluorescencia es constante, por lo que sólo son útiles los datos obtenidos en la parte media de la gráfica (14-39). Para realizar la cuantificación, se elige un valor umbral de unidades de fluorescencia justo donde inicia la fase exponencial de la reacción; al final de la corrida el equipo reporta el número de ciclo de amplificación al cual la muestra alcanzó dicho valor. Este dato se conoce como ciclo umbral y es el que se emplea para cuantificar el nivel de expresión del gen en estudio. De acuerdo a ello, mientras menor sea el ciclo umbral, mayor es el número de moléculas de DNA molde en la muestra.

Con un umbral establecido de 0.2 unidades de fluorescencia (línea horizontal verde en la Figura 5), se determinó el ciclo umbral y la concentración de cada dilución de la curva estándar (Tabla 5 y Figura 6).

Tabla 5. Ciclo umbral de la curva estándar de concentración del plásmido clonado con un fragmento del gen β -actina humano.

Número de Moléculas	5.11×10^8	5.11×10^7	5.11×10^6	5.11×10^5
Log número de moléculas	8.7084209	7.7084209	6.7084209	5.7084209
Ciclo umbral	18.41	21.43	24.86	28.43

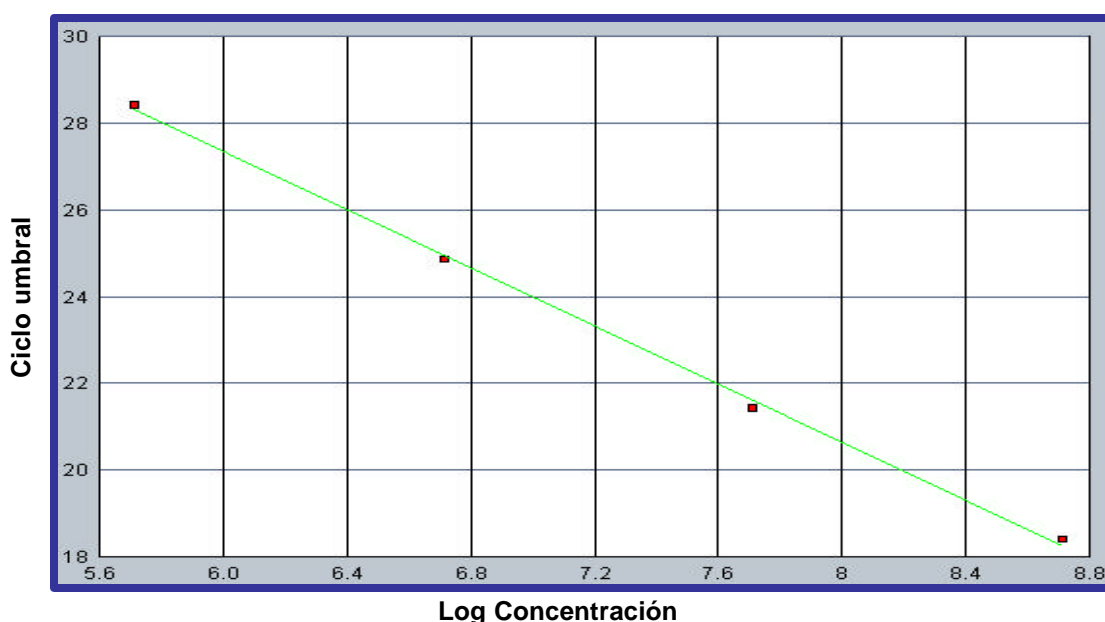


Figura 6. Regresión lineal de la curva estándar de concentración de β -actina. Muestras de 1 μ l de diluciones decimales (5.11×10^8 , 5.11×10^7 , 5.11×10^6 y 5.11×10^5 moléculas), hechas a partir de una concentración conocida del vector *pCR-Blunt II TOPO* clonado con un fragmento del gen β -actina humano. La gráfica muestra el ciclo umbral con respecto al logaritmo de la concentración.

Al graficar los datos de ciclo umbral con respecto al logaritmo del número de moléculas en la Tabla 5 se obtuvo la línea de la Figura 6. Este tipo de gráficas pueden expresarse matemáticamente por medio de la ecuación: $Y = m \log X + b$, en donde: **Y** es el ciclo umbral, **X** es el número de moléculas o copias de DNA o RNA del gen en estudio, **m** es la pendiente de la recta y **b** es la ordenada al origen.

Mediante la regresión lineal de los datos reportados para la curva estándar de concentración (Tabla 5) se obtuvo la ecuación: $Y = -3.34904 \log X + 47.42392$, que da una $R^2 = 0.998653$, donde R^2 representa la concordancia de los datos (puntos rojos, Figura 6) con la línea recta que mejor los une (línea verde, Figura 6). Un valor > 0.99 se considera aceptable, como fue el caso presente lo cual permite concluir que la concentración es directamente proporcional al ciclo umbral reportado. Por lo tanto, esta ecuación es útil para calcular el número de copias de la secuencia de DNA en estudio. Este parámetro está representado por X en la ecuación de la recta. Al despejarlo se obtiene una fórmula para calcular el número de copias de RNAm de un gen determinado, siempre y cuando se conozca el ciclo umbral al cual inicia la fase exponencial de amplificación. La fórmula obtenida a partir de la curva estándar de concentración es:

$$X = \text{antilog} [(Y - 47.42392) / -3.34904]$$

Una vez que se comprobó que cada par de iniciadores amplificaba exclusivamente el gen de interés y con la curva de concentración de β -actina y la fórmula para calcular el número de copias de RNAm de cada gen, se procedió a realizar las reacciones de PCR cuantitativa (tiempo real) de cada muestra para cuantificar los niveles de expresión de los genes Cbl-b, Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1, NFATc-1, IL-2 y β -actina. La Figura 7 muestra los resultados de la PCR para el gen Cbl-b de las muestras de células activadas de una muestra control, una paciente con lupus inactivo y una paciente con lupus activo.

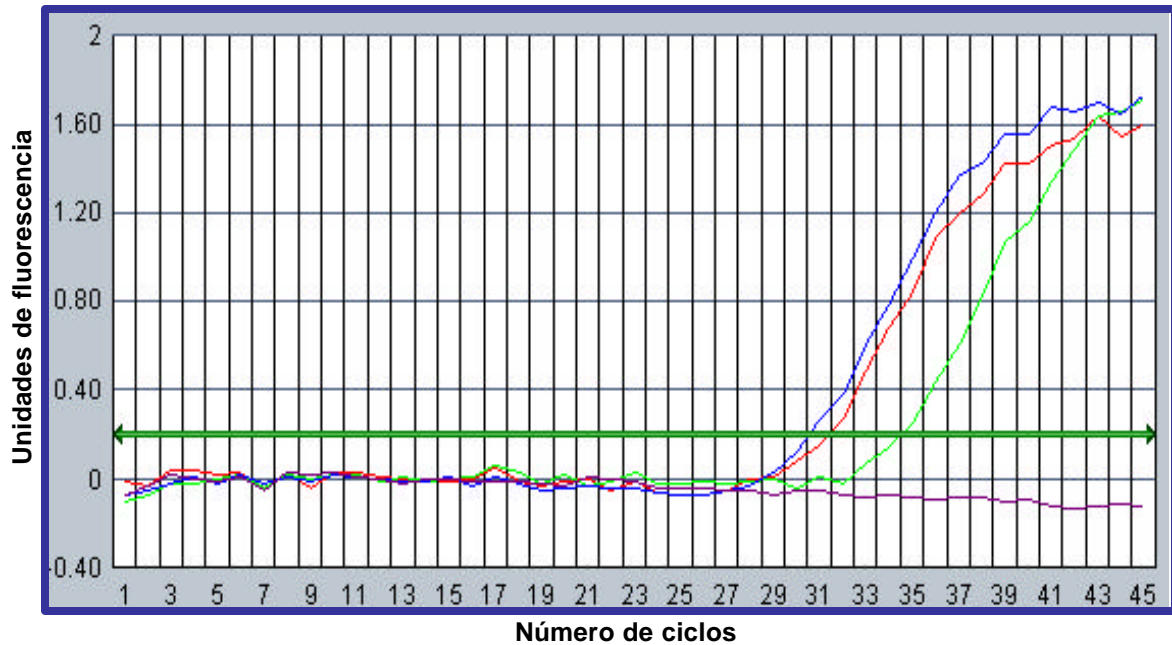


Figura 7. Ejemplo de ensayo de PCR en tiempo real. Muestras de 1 μ l de cDNA de células activadas se amplificaron para el gen Cbl-b durante 45 ciclos con el sistema Platinum Quantitative PCR-LUX, en el termociclador ABIPrism 7000, obteniéndose la gráfica de número de ciclos vs unidades de fluorescencia. Morado - control negativo, azul – control sano, verde - paciente con lupus inactivo, rojo - paciente con lupus activo. Esta gráfica es similar en parámetros y tendencia a la mostrada en la figura 6. En el eje de las X se presenta el número de ciclos y en el de las Y, las unidades de fluorescencia.

Una característica adicional del sistema de PCR en tiempo real, es que permite realizar curvas de disociación mediante aumento gradual de la temperatura de 60° a 99°C, que es otra forma de comprobar la especificidad de cada par de iniciadores empleado para la reacción. Como resultado de la disociación se obtiene una gráfica de unidades de fluorescencia con respecto a la temperatura. Cuando la amplificación es específica se observa un pico bien definido en la temperatura a la cual el 50% del producto de PCR se encuentra en la forma de DNA de doble cadena. La presencia de un solo pico es similar a la banda única observada en un corrimiento electroforético en agarosa. La Figura 8 muestra la disociación correspondiente a los productos de PCR para el gene Cbl-b de las muestras presentadas en la Figura 7. Claramente, la presencia de un solo pico muestra la amplificación de un solo producto y, por lo tanto, comprueba la especificidad de la reacción.

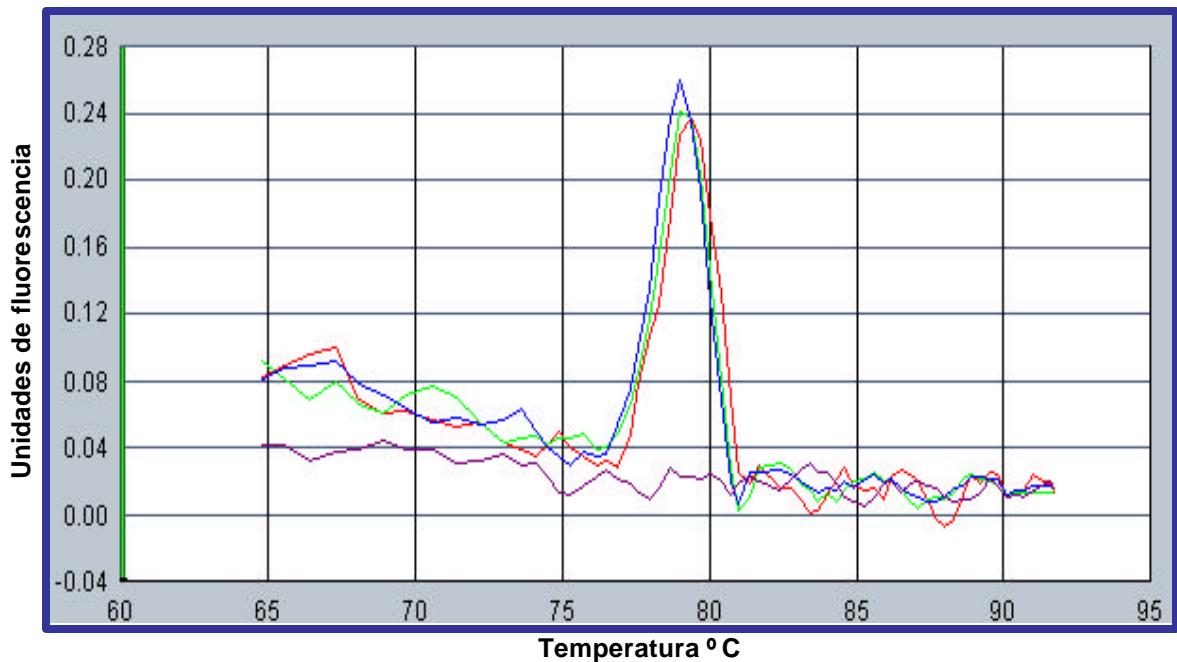


Figura 8. Comprobación de la especificidad de la reacción de PCR en tiempo real mediante curvas de disociación. Después de la amplificación del gen Cbl-b durante 45 ciclos, se realizó el aumento gradual en la temperatura de 60 a 99°C, para obtener la curva de disociación del producto de PCR. La presencia de un solo pico evidencia la especificidad de la reacción. Morado - control negativo, azul – control sano, verde - paciente con lupus inactivo, rojo - paciente con lupus activo.

Al realizar la amplificación y la curva de disociación del cDNA de las células en no activadas y activadas de cada muestra para los genes Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1, NFATc-1, IL-2 y β -actina, se obtuvieron curvas que, aunque diferían en los valores, seguían la misma tendencia. Por esta razón sólo se muestran las gráficas correspondientes al gen Cbl-b (Figuras 7 y 8) como ejemplo de los resultados obtenidos de los ensayos de PCR en tiempo real. Como se mencionó previamente, los valores de ciclo umbral (C_u) empleados para calcular el número de copias de RNAm de cada gen, fueron los reportados a un umbral de 0.2 en la escala de las unidades de fluorescencia (línea horizontal de color verde en la Figura 7). En cada caso se verificó que este punto se ubicara en la fase exponencial de la PCR.

Sustituyendo los valores correspondientes de C_u en la fórmula obtenida a partir de la curva estándar de concentración ($X = \text{antilog} [(C_u - 47.42392) / -3.34904]$), se calculó el número de copias de RNAm de los genes β -actina, Cbl-b, Csk, IL-2, NFATc-1, PTP-PEST, SHP-2 y SOCS-1. Estos datos se presentan en el Apéndice 5.

Una vez establecido el número de copias tanto del gen de referencia (β -actina) como de los genes problema (Cbl-b, Csk, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1 NFATc-1 e IL-2), se procedió a la normalización de los datos mediante el siguiente razonamiento:

Número de copias del gen de referencia (β -actina) = 1

Número de copias del gen problema = X

$$X = \frac{\text{Número de copias del gen problema}}{\text{Número de copias del gen de referencia } (\beta\text{-actina})}$$

Los resultados obtenidos de la normalización (Apéndice 6) se emplearon para construir gráficas de dispersión puntual (Figuras 9-15), en las que también se representa la mediana (línea azul horizontal) de cada grupo estudiado. A la izquierda se muestran los niveles de expresión de las células no activadas y a la derecha los de las células activadas para los tres grupos.

Para evaluar las diferencias en los niveles de expresión se realizó análisis estadístico para datos no paramétricos, mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, comparando los tres grupos entre sí. Las diferencias, cuando las hubo, fueron significativas sólo entre el grupo control y los dos grupos de LES. Además, sólo las células no activadas tuvieron alteraciones en los niveles de expresión de algunos genes (descritos abajo), las células activadas de las pacientes con LES tuvieron niveles de expresión similares al grupo control.

Así, comparando con los controles, las pacientes con LES inactivo tuvieron una evidente disminución en la expresión de Cbl-b, SHP-2 y NFATc-1 ($p=0.028$, $p=0.011$ y $p=0.018$; Figuras 9, 11 y 13, respectivamente) y ligera subexpresión de PTP-PEST y SOCS-1 ($p=0.045$ y $p=0.045$; Figuras 10 y 12, respectivamente).

Por su parte, las pacientes con LES activo sólo tuvieron evidente disminución en la expresión de SHP-2 ($p=0,019$, Figura 11) y moderada subexpresión de PTP-PEST

y NFATc-1 ($p=0.042$ y $p=0.042$, Figuras 10 y 13, respectivamente). Los niveles de expresión de Cbl-b y SOCS-1 en las células no activadas de este grupo de pacientes fueron similares al grupo control, Figuras 9 y 12, respectivamente.

A pesar de que para Csk no se encontró diferencia estadística entre ninguno de los tres grupos, los valores en las pacientes con LES fueron consistentemente inferiores a los de los controles, Figura 14.

En diversos estudios se ha encontrado que los pacientes con LES tienen una disminución en la producción de IL-2 (Dean, 2000). Sin embargo, en nuestras pacientes la expresión de IL-2, que se incluyó como control de activación, se encontró consistentemente elevada en las células no activadas, tanto en las pacientes con lupus inactivo como activo ($p=0.022$ y $p=0.015$, respectivamente, Figura 15). Al igual que con el resto de los genes, estas diferencias desaparecieron al activar las células.

Un aspecto importante, es que sólo las células no activadas tienen las alteraciones en los niveles de expresión de los genes indicados, las células activadas no presentan diferencias.

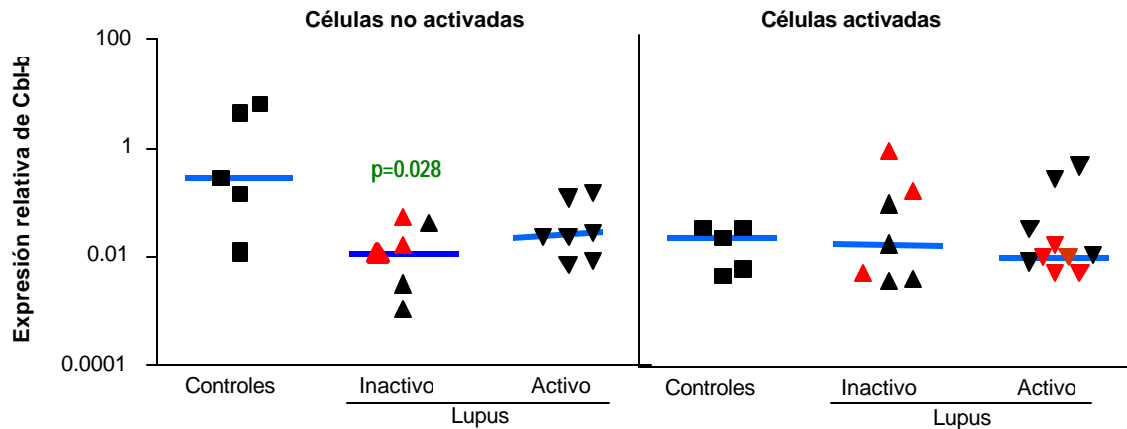


Figura 9. Subexpresión de Cbl-b en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo. Se determinó el nivel de expresión de Cbl-b mediante PCR en tiempo real de células linfoides no activadas o activadas con ionomicina/PMA durante 24 horas, de controles sanas (cuadros), pacientes con lupus inactivo (triángulos) o con lupus activo (cuñas). Los símbolos negros en pacientes indican tratamiento inmunosupresor y los símbolos rojos sin tratamiento. Se muestra el nivel de expresión, normalizado con respecto a β -actina, de cada muestra y la mediana (línea azul horizontal) de cada grupo. A la izquierda están los datos de las células no activadas y a la derecha los de células activadas.

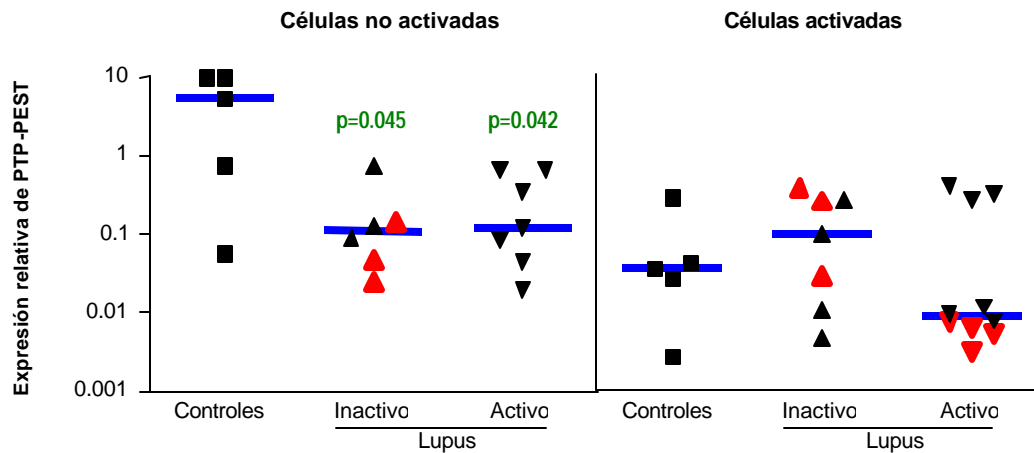


Figura 10. Subexpresión de PTP-PEST en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo y activo. Se determinó el nivel de expresión de PTP-PEST mediante PCR en tiempo real de células linfoides no activadas o activadas con ionomicina/PMA durante 24 horas, de controles sanas (cuadros), pacientes con lupus inactivo (triángulos) o con lupus activo (cuñas). Los símbolos negros en pacientes indican tratamiento inmunosupresor y los símbolos rojos sin tratamiento. Se muestra el nivel de expresión, normalizado con respecto a β -actina, de cada muestra y la mediana (línea azul horizontal) de cada grupo. A la izquierda están los datos de las células no activadas y a la derecha los de células activadas.

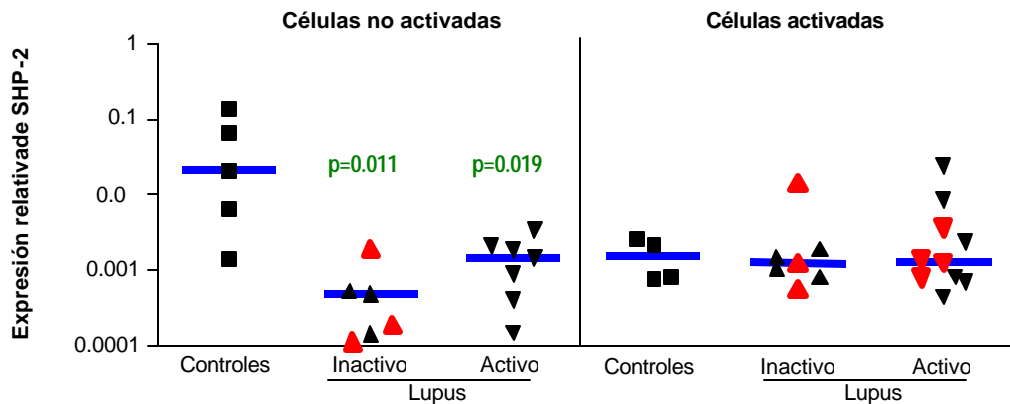


Figura 11. Subexpresión de SHP-2 en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo y activo. Se determinó el nivel de expresión de SHP-2 mediante PCR en tiempo real de células linfoides no activadas o activadas con ionomicina/PMA durante 24 horas, de controles sanas (cuadros), pacientes con lupus inactivo (triángulos) o con lupus activo (cuñas). Los símbolos negros en pacientes indican tratamiento inmunosupresor y los símbolos rojos sin tratamiento. Se muestra el nivel de expresión, normalizado con respecto a β -actina, de cada muestra y la mediana (línea azul horizontal) de cada grupo. A la izquierda están los datos de las células no activadas y a la derecha los de células activadas.

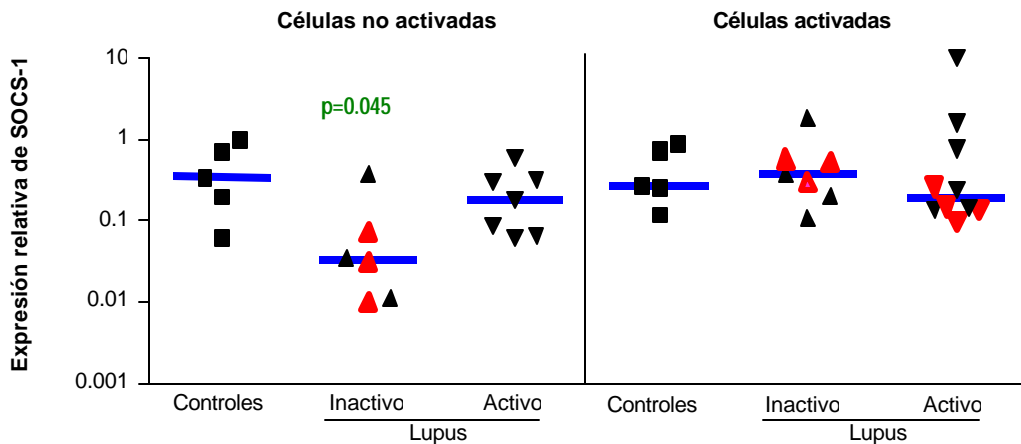


Figura 12. Subexpresión moderada de SOCS-1 en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo. Se determinó el nivel de expresión de SOCS-1 mediante PCR en tiempo real de células linfoides no activadas o activadas con ionomicina/PMA durante 24 horas, de controles sanas (cuadros), pacientes con lupus inactivo (triángulos) o con lupus activo (cuñas). Los símbolos negros en pacientes indican tratamiento inmunosupresor y los símbolos rojos sin tratamiento. Se muestra el nivel de expresión, normalizado con respecto a β -actina, de cada muestra y la mediana (línea azul horizontal) de cada grupo. A la izquierda están los datos de las células no activadas y a la derecha los de células activadas.

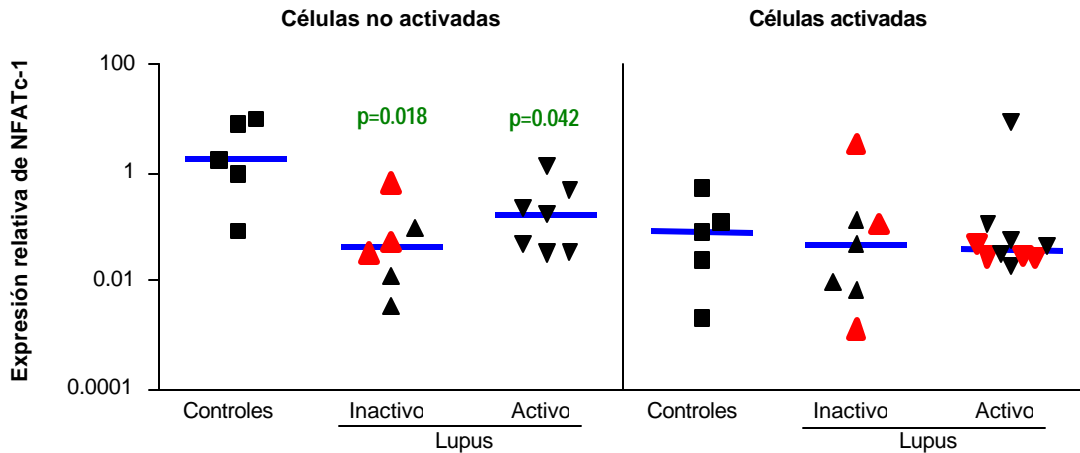


Figura 13. Subexpresión de NFATc-1 en células linfoides no activadas de pacientes con LES inactivo y activo. Se determinó el nivel de expresión de NFATc-1 mediante PCR en tiempo real de células linfoides no activadas o activadas con ionomicina/PMA durante 24 horas, de controles sanas (cuadros), pacientes con lupus inactivo (triángulos) o con lupus activo (cuñas). Los símbolos negros en pacientes indican tratamiento inmunosupresor y los símbolos rojos sin tratamiento. Se muestra el nivel de expresión, normalizado con respecto a β -actina, de cada muestra y la mediana (línea azul horizontal) de cada grupo. A la izquierda están los datos de las células no activadas y a la derecha los de células activadas.

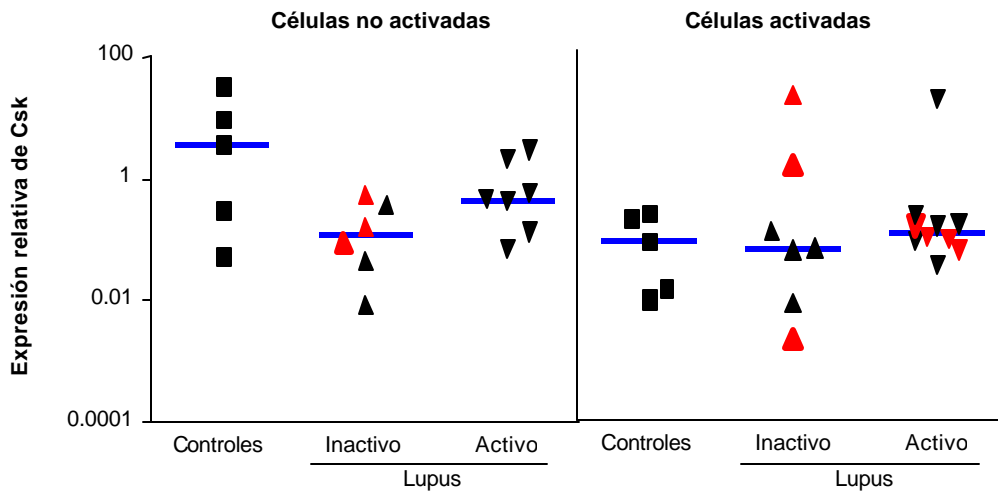


Figura 14. El nivel de expresión de Csk es normal en las células linfoides no activadas y activadas de pacientes con LES. Se determinó el nivel de expresión de Csk mediante PCR en tiempo real de células linfoides no activadas o activadas con ionomicina/PMA durante 24 horas, de controles sanas (cuadros), pacientes con lupus inactivo (triángulos) o con lupus activo (cuñas). Los símbolos negros en pacientes indican tratamiento inmunosupresor y los símbolos rojos sin tratamiento. Se muestra el nivel de expresión, normalizado con respecto a β -actina, de cada muestra y la mediana (línea azul horizontal) de cada grupo. A la izquierda están los datos de las células no activadas y a la derecha los de células activadas.

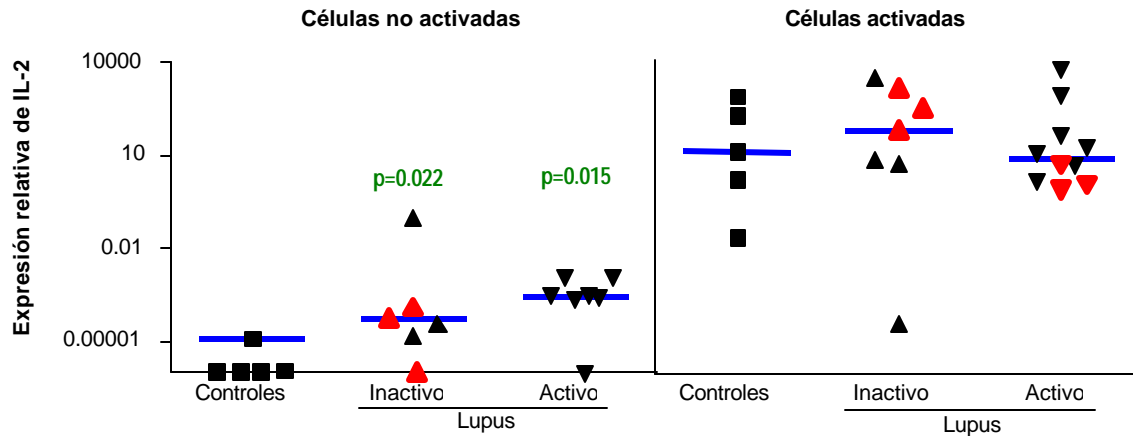


Figura 15. Sobreexpresión de IL-2 en células linfoides no activadas de pacientes con LES. Se determinó el nivel de expresión de IL-2 mediante PCR en tiempo real de células linfoides no activadas o activadas con ionomicina/PMA durante 24 h, de controles sanas (cuadros), pacientes con lupus inactivo (triángulos) o con lupus activo (cuñas). Los símbolos negros en pacientes indican tratamiento inmunosupresor y los símbolos rojos sin tratamiento. Se muestra el nivel de expresión, normalizado con respecto a β -actina, de cada muestra y la mediana (línea azul horizontal) de cada grupo. A la izquierda están los datos de las células no activadas y a la derecha los de células activadas.

Las alteraciones en la expresión génica en LES no tienen relación con el grado de actividad (SLEDAI).

Debido a que sólo las células no activadas presentaron diferencia significativa al aplicar el análisis estadístico, para determinar si el nivel de expresión de cada uno de los genes analizados se relacionaba directamente con la actividad de la enfermedad, se consideraron únicamente los datos de las células no activadas de las pacientes con lupus activo.

Se construyeron gráficas en las que se relaciona el índice de actividad (eje X) con el nivel de expresión (eje Y), normalizado con respecto a β -actina, de cada gen en estudio. Cada punto representa una paciente. En cada gráfica se presenta, además, la mediana de los niveles de expresión del gen correspondiente en el grupo control, este valor se emplea como referencia para determinar si las pacientes con altos índices de actividad de la enfermedad presentan niveles bajos o altos de los genes analizados. Se excluyeron las gráficas de Cbl-b, Csk y SOCS-1 debido a que estos genes no presentaron diferencias en sus niveles de expresión en las células no activadas del grupo de lupus activo con respecto al grupo control.

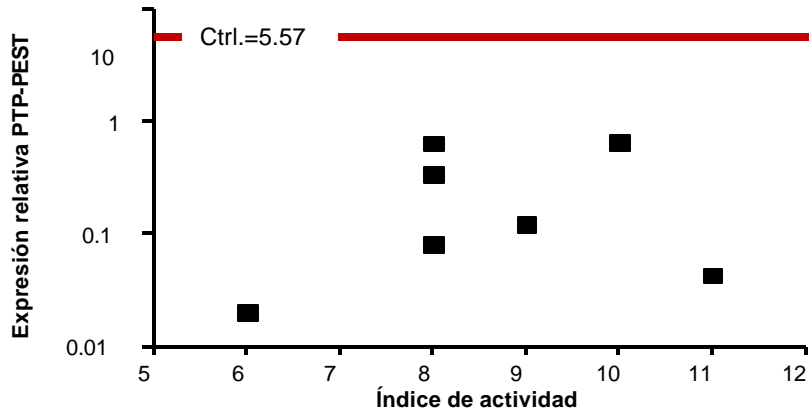


Figura 16. El nivel de expresión génica de PTP-PEST en pacientes con LES activo no está relacionado con la actividad de la enfermedad. Los niveles de expresión de PTP-PEST en las células linfoides no activadas de cada una de las pacientes con lupus activo, se graficaron con respecto a su índice de actividad. La línea roja representa la mediana de la expresión de PTP-PEST en el grupo control.

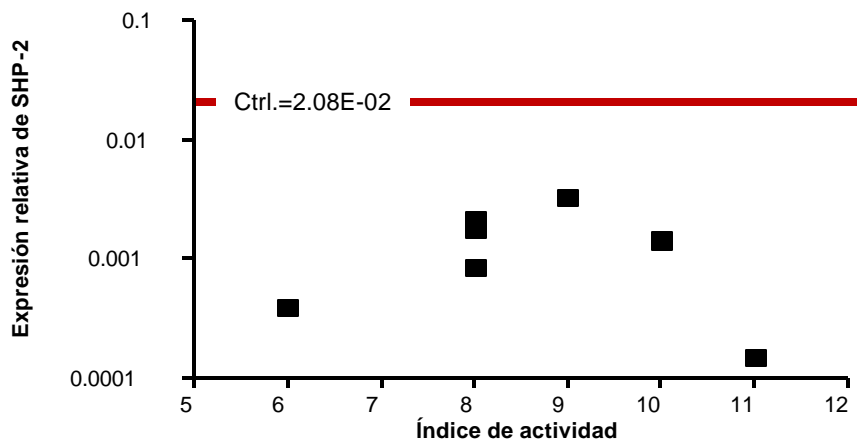


Figura 17. El nivel de expresión génica de SHP-2 en pacientes con LES activo no está relacionado con la actividad de la enfermedad. Los niveles de expresión de SHP-2 en las células linfoides no activadas de cada una de las pacientes con lupus activo, se graficaron con respecto a su índice de actividad. La línea roja representa la mediana de la expresión de SHP-2 en el grupo control.

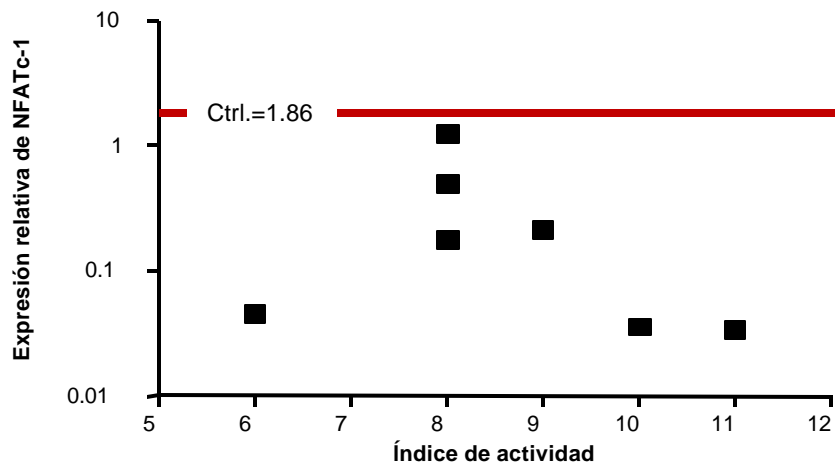


Figura 18. El nivel de expresión génica de NFATc-1 en pacientes con LES activo no está relacionado con la actividad de la enfermedad. Los niveles de expresión de NFATc-1 en las células linfoides no activadas de cada una de las pacientes con lupus activo, se graficaron con respecto a su índice de actividad. La línea roja representa la mediana de la expresión de NFATc-1 en el grupo control.

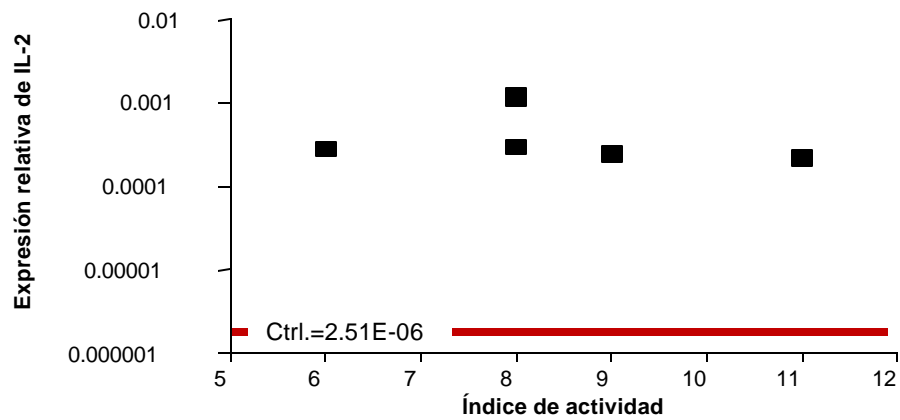


Figura 19. El nivel de expresión génica de IL-2 en pacientes con LES activo no está relacionado con la actividad de la enfermedad. Los niveles de expresión de IL-2 en las células linfoides no activadas de cada una de las pacientes con lupus activo, se graficaron con respecto a su índice de actividad. La línea roja representa la mediana de la expresión de IL-2 en el grupo control.

Como se observa en las gráficas de las Figuras 16, 17 y 19, no hay una tendencia en los niveles de expresión de los genes PTP-PEST, SHP-2 e IL-2, respectivamente, con respecto al índice de actividad. En estas proteínas, los niveles de expresión más bajos se presentan en pacientes con índices de actividad muy diferentes, 6 y 11, mientras que las pacientes con índices de actividad de 8 a 10 presentan niveles de expresión ligeramente mayores. En el caso de NFATc-1 (Figura 18), se observa cierta tendencia a menor expresión del gen cuando la actividad es mayor, puesto que las pacientes con índice de actividad 10 y 11 tienen los niveles de expresión más bajos. Sin embargo, hay una paciente con índice de actividad de 6 que también tiene baja expresión de NFATc-1.

Las alteraciones observadas no se relacionan con el patrón de afección orgánica del LES.

Considerando que el LES es una enfermedad en la que hay daño a nivel sistémico, y que aparentemente no hay correlación entre los niveles de expresión y el índice de actividad, se hicieron otro tipo de gráficas para determinar si los bajos niveles de expresión de los genes inmunorreguladores estudiados se relacionan con manifestaciones clínicas específicas. El índice de actividad representa todas las manifestaciones clínicas de la paciente en el momento de tomar la muestra. Sin embargo, la subexpresión de los genes estudiados podría relacionarse con el daño preferencial a ciertos órganos y tejidos.

Para construir estas gráficas, se incluyeron tanto las pacientes con lupus inactivo como aquéllas con lupus activo. En el caso de las pacientes con lupus inactivo, se revisó su historia clínica para evaluar las manifestaciones clínicas que presentaron durante la fase activa de la enfermedad. Para las pacientes con lupus activo, se consideraron las manifestaciones clínicas al momento de tomar la muestra, así como su historia. Posteriormente, se realizó una clasificación, dependiendo del órgano o tejido afectado, de las manifestaciones clínicas predominantes de las pacientes en cinco grupos: muco-cutáneas-serosas, serológicas, hematológicas, renales y sistema nervioso central.

Se hicieron gráficas de dispersión puntual en la que se relaciona el nivel de expresión de cada gen con el tipo de manifestaciones clínicas. Cada punto representa a una paciente. Cabe señalar que una paciente puede estar representada más de una vez, puesto que sus manifestaciones clínicas pueden caer en más de una clasificación. En este caso se analizaron todos los genes, excepto Csk, puesto que hubo diferencias entre las pacientes con LES inactivo o activo con respecto al control. En ningún caso se observó alguna tendencia. Por ello, sólo se muestra Cbl-b como ejemplo, Figura 20.

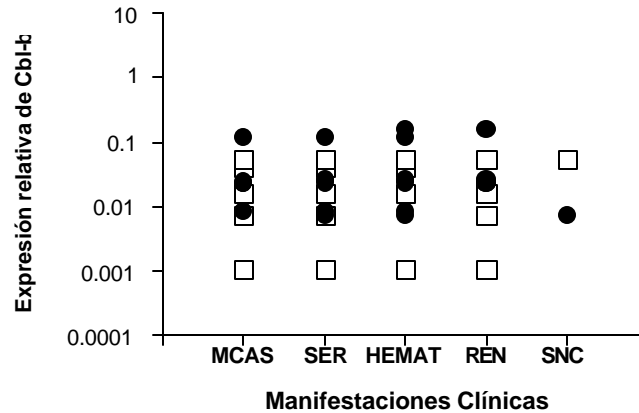


Figura 20. El nivel de expresión génica de Cbl-b en células linfoides de pacientes con LES no está relacionado con manifestaciones clínicas específicas. Se realizó una clasificación, dependiendo del órgano o tejido afectado, de las manifestaciones clínicas en cinco grupos: mucocutáneas-serosas (MCAS), serológicas (SER), hematológicas (HEMAT), renales (REN) y sistema nervioso central (SNC). Se graficó el nivel de expresión del gen en cada muestra de los grupos de LES inactivo (cuadros blancos) y LES activo (círculos negros).

9. Discusión

El LES es una enfermedad autoinmune compleja, con manifestaciones clínicas muy diversas, que puede afectar diversas partes del organismo, desde lesiones cutáneas, hasta daño a riñones y sistema nervioso central. Aunque se desconoce la causa de la enfermedad, se sabe que su patogenia puede estar influenciada por múltiples factores: ambientales, hormonales y genéticos. Debido a esta complejidad se han realizado numerosos estudios, tanto a nivel clínico como experimental, con el fin de elucidar la causa de la enfermedad y desarrollar estrategias terapéuticas que puedan controlar, y hasta evitar, la enfermedad.

Con base en los estudios realizados en ratones KO, nosotros consideramos posible que en el LES humano el desarrollo de autoinmunidad podría relacionarse con fallas en la regulación homeostática intracelular. Por esta razón se decidió evaluar el nivel de expresión de algunos genes relacionados con la regulación negativa de la respuesta inmune. Se eligieron seis genes cuya expresión disminuida o nula en ratones lleva al desarrollo de autoinmunidad. Estos genes son Cbl-b, Csk, , PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1 y NFATc-1. Además, se incluyó el gen β -actina como control de expresión basal e IL-2 como marcador de activación. El estudio se realizó en células linfoides de pacientes con LES inactivo o activo y se comparó con controles sanas.

En LES inactivo hubo una marcada disminución de la expresión de Cbl-b, SHP-2 y NFATc-1 y moderada de PTP-PEST y SOCS-1, con discreta sobreexpresión de IL-2, probablemente como reflejo de la disminución en estas proteínas de regulación negativa. En LES activo sólo estuvo disminuido significativamente SHP-2 y discretamente PTP-PEST y NFATc-1. Sin embargo, la expresión de IL-2 fue aún mayor que en lupus inactivo. En ambos grupos, sólo las células no activadas mostraron estas diferencias.

Los resultados obtenidos indican que la disminución en la expresión de algunos genes que codifican proteínas reguladoras de la actividad de linfocitos T y B está relacionada con el LES, independientemente de la actividad del padecimiento, lo cual sugiere su participación en la susceptibilidad y/o en la patogenia de la hiperreactividad inmunológica del LES. Se encontró que el RNAm que codifica Cbl-b, PTP-PEST, SHP-2, SOCS-1 y NFATc-1, cuya función es regular negativamente la respuesta inmune, está disminuido. En dos estudios recientes, publicados después de que iniciamos nuestro trabajo, se encontró que Cbl-b está disminuido en LES (Chen, 2004), mientras que Csk es normal (Jury, 2004), similar a lo encontrado en este trabajo. No hay estudios previos en relación a los otros genes aquí estudiados en pacientes con LES.

La marcada disminución en la expresión de Cbl-b, PTP-PEST, SHP-2 y NFATc-1 es interesante, ya que la expresión de estos genes contribuye en grado variable a la tolerancia en linfocitos T. En condiciones normales, la mayor translocación de NFAT al núcleo, en relación a factores de transcripción de las familias AP-1 y NFκB, es característica de la anergia por falta de coestimulación. La translocación de NFAT al núcleo depende predominantemente de la activación del TCR, a través de la elevación de Ca²⁺ citosólico, activación de calcineurina y defosforilación de NFAT citoplásmico. La activación disminuida del TCR podría producir un desbalance, aún en presencia de coestimulación baja, ya que al ser similares los niveles de NFAT a los de AP-1 y NFκB, los linfocitos T se activarían aún en presencia de señalización débil a través del TCR (Macián *et al*, 2002). Por lo tanto, la disminución en la expresión de NFATc-1 podría relacionarse con activación de células T en ausencia de coestimulación, como sería el caso de autoantígenos, y con la hiperactividad de linfocitos B que presentan los pacientes con LES y que ha sido reportado en los ratones KO para este gen (Macián *et al*, 2002). Además, la expresión disminuida de NFATc-1 sugiere deficiencias en la inducción de tolerancia ya que es un factor de transcripción indispensable para la activación de genes involucrados en la inducción de anergia, la cual es un mecanismo de eliminación de linfocitos autorreactivos, por

lo que su deficiencia podría causar que células autorreactivas no sean anergizadas y sean capaces de iniciar una respuesta inmune efectiva.

Otro hecho que parece comprobar una deficiente homeostasis inmunológica, es la sobreexpresión de IL-2 en las células no activadas de las pacientes. IL-2 es una citocina que se expresa después de que el linfocito T ha sido activado, por lo que su expresión en células no activadas sugiere cierto grado de actividad linfocítica, aún en ausencia de estimulación antigénica. Se determinó su nivel de expresión como un marcador de activación celular, sin embargo, el hecho de que se sobreexpresen en ambos grupos de pacientes con LES, sugiere que sus linfocitos T tienen alteraciones y, por lo tanto, están activados de forma basal, por lo que el tratamiento parece ser insuficiente para controlar esta actividad, a pesar de que clínicamente no es evidente.

El hallazgo de que la activación de células linfoides con ionomicina/PMA revierte a niveles normales la expresión de todos los genes estudiados sugiere que el defecto no está a nivel de su secuencia codificadora, sino en las vías fisiológicas que llevan a su expresión. Dado que el estímulo utilizado para activar las células es independiente de las interacciones de superficie celular, ya que la combinación ionomicina/PMA actúa a nivel de elevación de iones de Ca^{2+} (y activación-translocación de NFAT vía calcineurina) y PKC, la alteración podría estar en alguna de las moléculas que inician el proceso de señalización. Podría ser un receptor de superficie (TCR, CD28 o moléculas que señalizan negativamente como CTLA-4 o PD-1, entre otras), o bien alguna de las proteína-tirosina cinasa que fosforilan dichos receptores o complejos asociados durante la activación inicial de las células.

El hecho de que no hubieron diferencias en los niveles de expresión de los genes estudiados entre LES inactivo y activo, sugiere que ninguno de ellos está relacionado con el grado de actividad de la enfermedad. El mismo comportamiento se observa al evaluar el nivel de expresión con respecto a las manifestaciones clínicas. En este

caso, las alteraciones en los niveles de expresión de los genes no se relacionan claramente con algún tipo de lupus (manifestaciones clínicas).

Cabe señalar que el tipo de tratamiento, principalmente con inmunosupresores, no fue considerado como un factor de exclusión, sin embargo, sí se tomó en cuenta al realizar el análisis estadístico. Puesto que estadísticamente no se encontró diferencia entre los niveles de expresión de las pacientes sin tratamiento inmunosupresor comparadas con las pacientes que tenían dicho tratamiento, se consideró que el tratamiento no influyó en los bajos niveles de expresión de los genes Cbl-b, PTP-PEST, SHP-2 y NFATc-1, por lo que este aspecto no es tomado en cuenta en la interpretación de los resultados.

Los resultados de este trabajo sugieren fuertemente que las deficiencias en la homeostasis intracelular, principalmente en la regulación negativa de la señalización de los linfocitos, se asocian con procesos autoinmunes. Su posible relación causa-efecto es apoyada por los modelos experimentales en los que la inactivación de genes como Cbl-b (Naramura *et al*, 2002), Csk (Hermiston *et al*, 2002), SOCS-1 (Hanada *et al*, 2003) y NFATc-1 (Macián *et al*, 2002), resulta en fenotipos autoinmunes similares al LES. Los ratones con deficiencias en dichos genes tienen hiperactividad de linfocitos B y T, producción de autoanticuerpos y desarrollan autoinmunidad sistémica, al igual que los pacientes con LES. El hallazgo de que algunos pacientes con LES presentan deficiencias, principalmente, en la expresión de Cbl-b, SHP-2, SOCS-1 y NFATc-1, sugiere que las deficiencias en la homeostasis intracelular, asociadas a factores genéticos y ambientales, pueden ser la causa de procesos autoinmunes en humanos.

10. Conclusiones

- Los linfocitos no activados de pacientes con lupus activo o inactivo tienen una expresión disminuida del RNAm de Cbl-b, SHP-2, SOCS-1, y NFATc-1, correspondiente a proteínas que regulan negativamente su activación.
- Los linfocitos de pacientes con LES expresan IL-2 en condiciones basales y esta expresión aumenta discretamente durante la actividad del padecimiento.
- La activación de las células linfoides de pacientes con LES con agentes que actúan directamente sobre sistemas efectores citosólicos revierte las alteraciones observadas.
- Los resultados sugieren que, al menos en el grupo de pacientes estudiado, las alteraciones en la expresión de los genes estudiados depende de defectos en proteínas transmembranales, o cercanas a la membrana celular, que pueden ser directamente de los receptores específicos de linfocitos T y B, coestimulación o señalización a través de receptores inhibitorios.

11. Perspectivas

Para confirmar y ampliar lo encontrado en este trabajo, se sugiere:

- Aumentar el número de controles y pacientes, lo que permitirá relacionar los niveles de expresión génica con diferentes grados de severidad de la enfermedad y las diversas manifestaciones clínicas.
- Hacerlo en pacientes sin tratamiento, para confirmar que las alteraciones observadas son independientes de los inmunosupresores o antiinflamatorios.
- Hacer estudios independientes en linfocitos T y B.
- Realizar ensayos funcionales de las proteínas codificadas por los genes estudiados, tanto en actividad enzimática como en su interacción con otras moléculas.
- Activar específicamente a las células con anticuerpos anti-CD3/CD28, BCR/anti-CD40, además de estudio de la transducción y posibles mutaciones adicionales en genes que codifican receptores inhibitorios.
- Estudiar detalladamente los factores de transcripción que participan en la activación de linfocitos T y B.

12. Apéndices

Apéndice 1. Criterios para la clasificación del Lupus Eritematoso Sistémico* (Tan, et al, 1982).

Criterios	Definición
1. Erupción malar	Eritema localizado, liso o elevado, por encima de eminencias malares, tendiendo a expandirse a los pliegues nasolabiales.
2. Eritema discoide	Placas eritematosas elevadas con costras queratóticas adherentes y tapamiento folicular, puede ocurrir cicatrización atrófica en lesiones viejas.
3. Fotosensibilidad	Erupciones en piel como resultado de una reacción inusual a la luz solar, por la historia del paciente u observación del médico.
4. Úlceras orales	Úlceras orales o nasofaríngeas, sin dolor. Observadas por un médico.
5. Artritis	Artritis no erosiva que involucra dos o más articulaciones periféricas, caracterizadas por ser frágiles, hinchadas o expansivas.
6. Serositis	<ul style="list-style-type: none"> a) Pleuritis – historia convincente de dolor pleurítico por un médico o evidencia de efusión pleural. b) Pericarditis – documentada por ECG o evidencias de efusión pericardial.
7. Desórdenes renales	<ul style="list-style-type: none"> a) Persistencia de proteinuria mayor de 0.5g por día o mayor de 3 si la cuantificación no fue hecha. b) Restos celulares – pueden ser células rojas, hemoglobina, granulares, tubulares o mezcladas.
8. Desórdenes neurológicos	<ul style="list-style-type: none"> a) Ataques – en ausencia de drogas ofensivas o desórdenes metabólicos conocidos, por ejemplo: uremia, cetoacidosis o desbalance electrolítico. Psicosis - en ausencia de drogas ofensivas o desórdenes metabólicos conocidos, por ejemplo: uremia, cetoacidosis o desbalance electrolítico.
9. Desórdenes hematológicos	<ul style="list-style-type: none"> a) Anemia hemolítica – con reticulocitosis. b) Leucopenia – menos de 4000 leucocitos totales por mm³ en dos o más ocasiones. c) Linfopenia – menos de 1500 linfocitos por mm³ en en dos o más ocasiones. d) Trombocitopenia – menos de 100000 plaquetas por mm³ en ausencia de drogas ofensivas.
10. Desórdenes inmunológicos	<ul style="list-style-type: none"> a) Preparación de células LE positiva. b) Anticuerpos anti-DNA - anticuerpos para DNA nativo en títulos anormales. c) Anticuerpos anti-SM – presencia de anticuerpos para el antígeno nuclear Sm. d) Pruebas serológicas falso positivas para sífilis, que se sabe son positivas por los menos durante seis meses y son confirmadas por pruebas de ELISA para <i>Treponema pallidum</i>.
11. Anticuerpos antinucleares	Títulos anormales de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en algún punto del tiempo y en ausencia de drogas que se sabe están asociadas con el síndrome de “lupus inducido por drogas”.

*La clasificación propuesta está basada en 11 criterios. Para la identificación de pacientes con Lupus Eritematosos Sistémico se considera que el paciente debe de reunir 4 o más de los 11 criterios, de manera serial o simultánea, durante algún intervalo de la observación.

Apéndice 2. Carta de consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION

PROPÓSITO: El presente estudio busca determinar los genes que estén posiblemente relacionados con la patogenia y actividad del lupus eritematoso sistémico.

PROCEDIMIENTO:

Si accedo en participar sucederá lo siguiente:

- 1) Se revisará mi expediente clínico y radiológico.
- 2) Se me hará exploración física y responderé un breve cuestionario para actualizar mis datos.
- 3) Se me extraerán 50 ml de sangre del brazo con una aguja, para hacer análisis de autoanticuerpos antinucleares, complemento, citología hemática completa y determinación del perfil de expresión génica de linfocitos B y T.
- 4) De identificarse alteraciones, se realizarán citas subsecuentes para la evaluación y tratamiento de la alteración y/o enfermedad reumatológica identificada.

BENEFICIOS: En forma directa es posible que no obtenga ninguno, a excepción de la revisión especializada. Sin embargo, se podrá analizar si dichas alteraciones son debidas o no a la presencia de estos autoanticuerpos o a una expresión génica alterada en mis células B y/o T, lo que de acuerdo con el resultado pueda condicionar cambios en el tratamiento.

RIESGO: La toma de sangre venosa no implica ningún riesgo.

CONFIDENCIALIDAD: Toda la información obtenida en este estudio es confidencial y sólo será utilizada para los efectos del estudio en cuestión.

DERECHO A REHUSAR PARTICIPAR O ABANDONAR: Mi participación en esta investigación es totalmente voluntaria, por lo que soy libre de ingresar o abandonarla en cualquier momento, sin que esto afecte mi atención médica en un futuro.

PREGUNTAS: Los Dres. Medina/Molano/Dehesa/Juárez me han informado a este respecto, y se han ofrecido a responder mis preguntas. Si tengo más preguntas puedo ponerme en contacto con ellos directamente.

CONSENTIMIENTO:

Libremente acepto en participar en este estudio, he recibido una copia de este impreso y he tenido la oportunidad de leerlo y discutirlo.

NOMBRE DEL PACIENTE

FIRMA

FECHA

NOMBRE DEL TESTIGO

FIRMA

FECHA

NOMBRE DEL MEDICO

FIRMA

FECHA

Apéndice 3. Cuestionario clínico.

Nombre: _____
 Edad: _____ Sexo: _____ Afiliación IMSS: _____
 Dirección: _____
 Colonia: _____ Delegación: _____
 C.P.: _____ Teléfono: _____
 Estado Civil: _____ Ocupación: _____
 Grupo sanguíneo y Rh _____

Edad de Inicio del LES: _____

Qué manifestaciones tuvo inicialmente?		Descripción*
Caída de cabello	S N	_____
Serositis	S N	_____
Úlceras orales	S N	_____
Fotosensibilidad	S N	_____
Eritema malar	S N	_____
Artritis	S N	_____
Miositis	S N	_____
Manifestaciones Renales	S N	_____
Manifestaciones Hematológicas	S N	_____
Manifestaciones Neurológicas	S N	_____
Manifestaciones pulmonares	S N	_____
Manifestaciones GI	S N	_____
Vasculitis (sitio)	S N	_____
Fiebre no infecciosa	S N	_____
Pérdida de peso	S N	_____
Fatiga	S N	_____

*Hojas adicionales de ser necesario

Tratamiento instituido inicialmente:

<i>Fármaco</i>	<i>Dosis</i>	<i>Tiempo de uso</i>	<i>Efectos adversos</i>

De las manifestaciones clínicas mencionadas arriba, qué otras ha tenido posteriormente?

En caso de actividad actual, datos físicos (desde cuando).

En caso de LES inactivo, datos clínicos del último período de actividad, y tiempo de inactividad

¿Biopsia renal? SI NO

Fecha _____ Descripción: _____

Otra(s) enfermedad(es)

Familiares con LES u otras enfermedades autoinmunes (parentesco)

Datos de Laboratorio.

Biometría Hemática

Fecha								
Leucocitos								
Neutrófilos								
Eosinófilos								
Basófilos								
Monocitos								
Eritrocitos								
Hb								
Ht								
Plaquetas								
VSG								

Química Sanguínea

Fecha								
Glucosa								
Urea								
BUN								
Creatinina								

Enzimas

Fecha								
DHL								
CK								
Aldolasa								
FA								
Proteínas tot.								
Albumina								
Globulinas								

Inmunológicas

Fecha								
C3								
C4								
Anti-DNA								
CRP								

Coagulación

Fecha								
TP								
TTP								

Urinarias:

Fecha								
Densidad								
Color								
pH								
Eritrocitos								
Glucosa								
Cilindros (T)								
Prot. (24h)								
Dep. Creat.								
Vol 24 hs.								

Apéndice 4. Índice de actividad del Lupus Eritematoso Sistémico, SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*).

Puntuación	Manifestaciones clínicas	Definición
8	Crisis convulsivas	De inicio reciente, excluir causas metabólicas, infecciosas o por drogas.
8	Psicosis	Alteraciones graves en la percepción de la realidad, alucinaciones, incoherencia, asociaciones vagas, alteraciones del pensamiento lógico, conducta anormal. Excluir uremia u otras causas metabólicas.
8	Síndrome orgánico cerebral	Alteraciones de la memoria, orientación u otra funciones intelectuales, de inicio rápido y características clínicas fluctuantes. Trastornos de la atención e incapacidad para concentrarse. Además de dos de los siguientes datos: trastornos perceptivos, lenguaje incoherente, insomnio o somnolencia diurna, aumento o disminución en la actividad psicomotora. Excluir causas metabólicas, por drogas o infecciosas.
8	Trastornos visuales	Cambios retinianos típicos: cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudados serosos o hemorrágicos en la coroides, neuritis óptica. Excluir causas metabólicas, por drogas o infecciosas.
8	Trastornos de pares craneales	Inicio reciente de neuropatía sensitiva o motora en nervios craneales.
8	Cefalea lúpica	Dolor de cabeza persistente y grave, puede ser migrañoso y no responde a analgésicos narcóticos.
8	Accidente cerebrovascular	De reciente aparición, excluir aterosclerosis y hemorragia.
8	Vasculitis	Úlceras, gangrena, nódulos hipersensibles en los dedos, infartos periungueales, hemorragias en astilla, biopsia y angiografía diagnóstica de vasculitis.
4	Artritis	Más de dos articulaciones con dolor y signos de inflamación.
4	Miositis	Dolor o debilidad muscular proximal, con elevación de CK y/o aldolasa, cambios en EMG o biopsia diagnóstica.
4	Cilindros urinarios	Granulosos o eritrocíticos.
4	Hematuria	Más de 5 eritrocitos por campo. Excluir otras causas: litiasis o infección.
4	Proteinuria	Más de 0.5 g de proteínas en 24 hrs en relación a la determinación previa.
4	Piuria	Más de 5 leucocitos por campo. Excluir otras causas (infección).
2	Eritema malar	De nueva aparición o recurrencia, inflamatorio, fotosensible.
2	Alopecia	Nueva o recurrente, localizada o difusa.
2	Úlceras mucosas	Nuevas o recurrentes, orales o nasales.
2	Pleuritis	Dolor pleurítico con derrame, frote o engrosamiento pleural.
2	Pericarditis	Dolor pericárdico con el menos uno de los siguientes hallazgos: frote, derrame, confirmación ECG o ecocardiografía.
2	Hipocomplementemia	Disminución de C3 a menos de la mitad del límite normal.
2	Anti-DNA	FARR > 25 U/ml.

Apéndice 5. Número de copias de RNAm de genes inmunorreguladores en células linfoides de *A* Controles, *B* Lupus inactivo y *C* Lupus activo.

A Controles

Gen	b-Actina	Cbl-b	Csk	IL-2	NFATc-1	PTP-PEST	SHP-2	SOCS-1
Clave	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm
7NA	560.05	3813.30	18924.42	0	4719.16	5565.79	77.32	194.26
8NA	3189.09	15935.82	31476.14	0	33485.35	17788.91	66.46	3278.01
10NA	24406.31	3659.19	89504.10	0	45626.98	19186.45	164.71	4986.00
29NA	2234901.03	29587.49	694464.65	28.14	201457.15	132446.64	3233.24	138976.85
40NA	795.26	250.54	42.22	0	773.69	7849.17	55.58	587.66
7A	3239653.27	108504.80	749023.39	40118900.24	290026.04	117029.19	6840.77	830394.25
10A	358922.63	7795.39	66595.96	8583.03	47548.56	9713.76	270.22	87676.89
38A	1325340.88	8236.17	18924.42	226883782.61	2997.74	56465.81	1098.62	908032.57
43A	89067022.43	414672.63	7241897.53	153322335.91	2377561.0	249313.92	229570.12	10354300.17
45A	6935.49	227.55	65.11	4893891.64	4001.31	1970.84	0	5880.50

B Pacientes con lupus inactivo

Gen	b-actina	Cbl-b	Csk	IL-2	NFATc-1	PTP-PEST	SHP-2	SOCS-1
Clave	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm
4NA	999780.01	16836.89	165040.57	133.10	32801.76	23908.06	0	71827.90
9NA	5932809.41	6609.60	256265.56	99.71	76940.05	754190.93	811.83	64345.51
22NA	2057913.57	15291.81	176786.87	113.63	112299.7	101295.39	373.30	64789.43
30NA	17911.63	997.80	9450.26	0	12021.30	2559.27	33.65	181.36
31NA	2599852.81	106289.70	992929.74	93.09	247605.68	235971.25	1397.51	89504.10
36NA	20980.30	66.46	171.65	2053.84	71.19	15082.97	10.24	8123.69
4A	8524.22	7031.51	151970.59	495837.72	28983.47	2230.48	10.10	2340.45
9A	959376.04	3813.30	59249.83	34.35	48206.90	237599.22	752.70	97201.75
23A	259813.74	4466.60	29587.49	1289388.73	37637.06	2703.99	375.87	90121.59
30A	1137.04	177.65	1614.58	1510289.73	134.94	416.71	15.05	608.22
31A	105561.42	9068.35	857.74	286632270.7	1129.25	10263.01	195.60	176786.87
35A	1147157.52	5414.81	2472.79	342735643.3	1636.94	31693.30	629.49	545937.07
36A	45093073.1	165040.57	2599852.8	284668330.2	330498.64	208503.02	48539.48	8541117.62

* La clave indica el número de paciente o control y el tipo de células (no activadas NA, o activadas A).

C Pacientes con lupus activo

Gen	b-actina	Cbl-b	Csk	IL-2	NFATc-1	PTP-PEST	SHP-2	SOCS-1
Clave	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm	Copias RNAm
2NA	1409941.08	11938.93	189369.19	402.63	65686.49	28391.78	556.21	87676.89
18NA	205655.57	32353.80	609421.07	248.82	263411.04	71827.90	437.25	18035.21
20NA	4149464.20	31260.48	290026.04	931.51	142851.95	179234.61	616.64	247605.68
24NA	239238.43	5800.20	133360.40	59.54	51994.14	29587.49	800.75	71827.90
27NA	79085.37	2184.95	36616.09	23.86	14080.81	6564.31	67.85	14573.28
32NA	43783.07	5377.71	90743.34	51.54	22014.72	28587.65	79.47	26872.32
47NA	25434.18	608.22	10993.45	0	925.12	17070.01	36.54	8123.69
2A	7918984.07	61322.06	1093255.18	125606885.93	889495.25	56855.37	18159.63	992929.74
3A	4178091.55	40593.91	339713.96	18961933.41	198705.93	49211.54	3189.09	576806.34
19A	138298182.5	666399.35	12128222.28	554593011.48	3847217.9	728704.84	180471.16	34016270.18
20A	875.61	222.90	194.26	4631982.46	52.25	229.12	7.11	1295.72
24A	1334484.47	6386.25	202847.02	979369.69	69400.64	10053.50	1603.52	122799.25
27A	2086406.81	31911.95	304325.62	20172326.54	71827.90	20132.42	1486.72	469301.69
32A	5304.27	2215.20	82984.63	3691740.84	47222.76	2111.11	114.41	46577.86
47A	131539.14	4141.26	4559.69	4961650.96	2594.71	39492.73	59.13	90743.34
48A	9468989.98	91999.75	557314.54	9600094.71	280225.30	29183.43	7688.93	1187278.79
50A	14702906.52	147848.13	1362295.47	19092752.70	447250.26	91369.39	50583.71	1921178.99

* La clave indica el número de paciente o control y el tipo de células (no activadas NA, o activadas A).

Apéndice 6. Niveles de expresión de genes inmunosupresores normalizados con respecto al gen de expresión constitutiva β -actina.

CLAVE*	CBL-B	CSK	IL-2	NFATc-1	PTP-PEST	SHP-2	SOCS-1
7NA	6.8088623	33.790632	0	8.4263286	9.9380395	0.138055	0.34687
8NA	4.9969809	9.8699463	0	10.499972	5.5780522	0.0208411	1.0278831
10NA	0.1499282	3.6672526	0	1.869475	0.7861265	0.0067488	0.2042914
29NA	0.0132388	0.3107362	1.259E-05	0.0901414	0.0592629	0.0014467	0.0621848
40NA	0.3150386	0.0530894	0	0.9728733	9.8699463	0.0698948	0.7389568
7A	0.0334927	0.2312048	12.383702	0.0895238	0.036124	0.0021116	0.256322
10A	0.0217188	0.1855441	0.0239133	0.1324758	0.0270637	0.0007529	0.244278
38A	0.0062144	0.0142789	171.189	0.0022619	0.0426047	0.0008289	0.6851313
43A	0.0046557	0.0813084	1.7214265	0.0266941	0.0027992	0.0025775	0.1162529
45A	0.032809	0.0093876	705.63076	0.5769333	0.2841677	0	0.8478864
4NA	0.0168406	0.1650769	0.0001331	0.032809	0.0239133	0	0.0718437
9NA	0.0011141	0.0431946	1.681E-05	0.0129686	0.1271221	0.0001368	0.0108457
22NA	0.0074307	0.0859059	5.522E-05	0.0545697	0.0492224	0.0001814	0.0314831
30NA	0.0557069	0.5276045	0	0.6711445	0.1428834	0.0018786	0.0101251
31NA	0.040883	0.3819177	3.581E-05	0.0952383	0.0907633	0.0005375	0.0344266
36NA	0.0031679	0.0081815	0.0978939	0.0033934	0.7189114	0.0004882	0.3872056
4A	0.824886	17.828089	58.16809	3.4001306	0.2616638	0.0011852	0.274565
9A	0.0039748	0.0617587	3.581E-05	0.0502482	0.2476602	0.0007846	0.1013177
23A	0.0171916	0.1138796	4.9627427	0.1448617	0.0104074	0.0014467	0.34687
30A	0.1562424	1.4199807	1328.26	0.1186756	0.3664833	0.0132388	0.5349095
31A	0.0859059	0.0081255	2715.3126	0.0106976	0.0972231	0.001853	1.6747299
35A	0.0047202	0.0021556	298.76947	0.0014269	0.0276277	0.0005487	0.4759042
36A	0.00366	0.0576553	6.312906	0.0073293	0.0046238	0.0010764	0.1894109
2NA	0.0084677	0.13431	0.0002856	0.0465881	0.0201369	0.0003945	0.0621848
18NA	0.1573203	2.9633093	0.0012099	1.2808359	0.3492631	0.0021261	0.0876962
20NA	0.0075336	0.0698948	0.0002245	0.0344266	0.0431946	0.0001486	0.0596717
24NA	0.0242444	0.5574372	0.0002489	0.2173319	0.1236737	0.0033471	0.3002356
27NA	0.0276277	0.4629945	0.0003017	0.1780457	0.0830029	0.0008579	0.1842728
32NA	0.1228263	2.0725672	0.0011771	0.5028135	0.6529386	0.0018152	0.6137605
47NA	0.0239133	0.4322316	0	0.0363732	0.6711445	0.0014368	0.3194005
2A	0.0077437	0.138055	15.86149	0.1123244	0.0071796	0.0022932	0.125386
3A	0.0097159	0.0813084	4.5384198	0.047559	0.0117785	0.0007633	0.138055
19A	0.0048186	0.0876962	4.0101251	0.0278183	0.0052691	0.0013049	0.2459632
20A	0.2545657	0.2218612	5289.9928	0.0596717	0.2616638	0.0081255	1.479783
24A	0.0047856	0.152004	0.7338937	0.0520056	0.0075336	0.0012016	0.09202
27A	0.0152952	0.1458611	9.6684532	0.0344266	0.0096493	0.0007126	0.224933
32A	0.4176253	15.644876	695.99423	8.902784	0.3980021	0.02157	8.7812021
47A	0.0314831	0.0346641	37.719958	0.0197258	0.3002356	0.0004495	0.6898581
48A	0.0097159	0.0588568	1.0138457	0.029594	0.003082	0.000812	0.125386
50A	0.0100557	0.0926548	1.29857	0.0304192	0.0062144	0.0034404	0.1306666

* La clave indica el número de paciente o control y el tipo de células (no activadas NA, o activadas A).

13. Bibliografía

1. Abbas A.K., and Lichtman A.H. Cellular and Molecular Immunology, edn 5. W.B. Saunders Company, USA 2003.
2. Abe K., Takasaki Y., Ushiyama C., Asakawa J., Fukazawa T. Seki M., Hiroshima M., Ogaki M. and Hashimoto H. "CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus". J Clin Immunol 1999, **19**:58-66.
3. Alexander W.S., Starr R., Fenner J.E., Scott C.L., Handman E., Sprigg N.S., Corbin J.E., Cornish A.L., Darwinche R., Owczarek C.M., *et al.* "SOCS1 is a critical inhibitor of interferon γ signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine". Cell 199, **98**:597-608.
4. Aringer M., Wintersberger W., Steiner C.W., Keiner H., Presterl E., Jaeger U., Smolen J.S. and Graininger W.B. "High levels of Bcl-2 protein in circulating T lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus". Arthritis Rheum 1994, **37**:1423-1430.
5. Arnett F.C. "The genetics of human lupus". In Dubois' Lupus Erythematosus, edn 5. Edited by Wallace D.J., Hahn B.H. Baltimore: Wilkins and Wilkins; 1997:77-118.
6. Bijl M., Horst G., Limburg P.C. and Kallenberg C.G.M. "Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus". Ann Rheum Dis 2001, **60**:523.
7. Billadeau D.D. and Leibson P.J. "ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation". J Clin Invest 2002, **109**:161-168.
8. Chen Y.-J., Lee Y.-L., Liu G.-Y., Pai L.-M. and Shen C.-R. "Reduced expression of Cbl-b in juvenile SLE". 2004. Abstract
9. Chuvpilo S., Jankevics E., Tyrsin D., Akimzhanov A., Moroz D., *et al.* "Autoregulation of NFATc-1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis". Immunity 2002, **16**:881-895.
10. Coutinho A. and Poltorack A. "Innate immunity: from lymphocyte mitogens to toll-like receptors and back". Curr Op Immunol 2003, **15**:599-602.
11. Cornall R.J., Cyster J.G., Hibbs M.L., Dunn A.R., Otipoby K.L. Clark E.A. and Goodnow C.C. "Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22 and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection". Immunity 1998, **8**:497-508.
12. Cutolo M., Sulli A., Villaggio B., Seriola B. and Accardo S. "Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus". Ann Rheum Dis 1998, **57**:573.
13. Davidson A. and Diamond B. "Autoimmune diseases". N Engl J Med 2001, **345**:340-350.
14. Davidson D. and Veillette A. "PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates". Europ Mol Biol Org J 2001, **20**:3414-3426.
15. Dean G.S., Tyrell-Price J., Crawley E. and Isenberg D.A. "Cytokines and systemic lupus erythematosus". Ann Rheum Dis 2000, **59**:243.

16. Devi B.S., van Noordin S., Krausz T. and Davies K.A. "Peripheral blood lymphocytes in SLE-hyper expression of CD154 on T and B lymphocytes and increased number of double negative T cells". *J Autoimmun* 1998, **11**:471-475.
17. Dustin M.L. "Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready". *J Clin Invest* 2002, **109**:155-160.
18. Frauwirth K.A. and Thompson C.B. "Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation". *J Clin Invest* 2002, **109**:295-299.
19. Gaffney P.M., Kearns G.M., Shark K.B., Ortmann W.A., Selby S.A., Malmgren M.L., Rohlf K.E., Ockenden T.C., Messner R.P., King R.A., Rich S.S. and Behrens T.W. "A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families". *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:14875-14879.
20. Gianani R. and Sarvetnick N. "Viruses, cytokines, antigens, and autoimmunity". *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:2257-2259.
21. Goodnow C.C., Cyster J.H., Hartley S.B., Bell S.E., Cooke M.P., Healy J.I., Akkaraju S., Rathmell J.C., Pogue S.L. and Shokat K.P. "Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development". *Adv Immunol* 1995, **59**:279-368.
22. Hahn B.H. "An overview of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus" In *Dubois' Lupus Erythematosus*, edn 5. Edited by Wallace DJ, Hahn BH. Baltimore: Wilkins and Wilkins; 1997:69-76.
23. Hämmerling G.J., Schönrich G., Ferber I. and Arnold B. "Peripheral tolerance as a multi-step mechanism". *Immunolog Rev* 1993, **133**:93-104.
24. Hanada T., Yoshida H., Kato S., Tanaka K., Masutani K., Tsukada J., Nomura Y., Mimata H., Kubo M and Yoshimura A. "Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity". *Immunity* 2003, **19**:437-450.
25. Harley J.B., Moser K.L., Gaffney P.M. and Behrens T.W. "The genetics of human systemic lupus erythematosus". *Curr Op Immunol* 1998, **10**:690-696.
26. Hermiston M.L., Xu Z., Majeti R. And Weiss A. "Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases". *J Clin Invest* 2002, **109**:9-14.
27. Imamoto A. and Soriano P. "Disruption of the *csk* gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice". *Cell* 1993, **73**:1117-1124.
28. James J.A., Kaufman K.M., Farris A.D., Taylor-Albert E., Lehman T.J. and Harley J.B. "An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus". *J Clin Invest* 1997, **100**:3019-3026.
29. Janeway C.A., Travers P., Walport M. and Capra J.D. *Immunobiology*. "Immune responses in the absence of infection". In *The Immune System in Health and Disease*, edn 4. *Curr Biol Public* 1999:489-536.
30. Jang I. and Gu H. "Negative regulation of TCR signaling and T-cell activation by selective protein degradation". *Curr Op Immunol* 2003, **15**:315-320.
31. Janssen E. and Zhang W. "Adaptor proteins in lymphocyte activation". *Curr Op Immunol* 2003, **15**:269-276.

32. Jury E., Kabouridis P., Flores-Borja F., Mageed R. and Isenberg D. "Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus". *J Clin Invest* 2004, **113**:1176-1187.
33. Kamradt T. and Mitchison A. "Tolerance and autoimmunity". *N Engl J Med* 2001, **344**:655-664.
34. Kato K., Santana-Sahagún E., Rassenti L., Weisman M.H., Tamura N., Kobayashi S., Hashimoto H and Kipps T.J. "The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus". *J Clin Invest* 1999, **104**:947-955.
35. Kimberly R.P. "Research advances in systemic lupus erythematosus". *J Am Medic Assoc* 2001, **285**:650-651.
36. Kono D.H. and Theofilopoulos A.N. "The genetics of murine systemic lupus erythematosus". In *Dubois' Lupus Erythematosus*, edn 5. Edited by Wallace DJ, Hahn BH. Baltimore: Wilkins and Wilkins; 1997:119-132.
37. Koretzky G. "Stimulation and inhibition of immune responses: an intricate balancing act". *J Clin Invest* 2002, **109**:7-8.
38. Kotzin B.L. "Systemic lupus erythematosus". *Cell* 1996, **85**:303-306.
39. Krebs D.L. and Hilton D.J. "SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling". *J Cell Sci* 2000, **113**:2813-2819.
40. Lanier L.L. "Face off – the interplay between activating and inhibitory immune receptors". *Curr Op Immunol* 2001, **13**:326-331.
41. Lee K.M., Chiang E., Griffin M., Khattri R., Hong D.K., Zhang W., Straus D., Samelson L.E., Thompson C.B. and Bluestone J.A. "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4". *Science* 1998, **282**:2263-2266.
42. Leo A. and Schraven B. "Adapters in lymphocyte signaling". *Curr Op Immunol* 2001, **13**:307-316.
43. Leo A., Wienands J., Baier G., Horejsi V. and Schraven B. "Adapters in lymphocyte signaling". *J Clin Invest* 2002, **109**:301-309.
44. Liang B., Gee R.J., Kashgarian M.J., Sharpe A.H. and Mamula M.J. "B7 costimulation in the development of lupus: autoimmunity arises either in the absence of B7.1/B7.2 or in the presence of anti-B7.1/B7.2 blocking antibodies". *J Immunol* 1999, **163**:2322-2329.
45. Liu M.F., Liu H.S., Wang C.R. and Lei H.Y. "Expression of CTLA-4 molecule in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus". *J Clin Immunol* 1998, **18**:392-398.
46. Macián F., García-Cózar F., Im S., Horton H.F., Byrne M.C. and Rao A. "Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance". *Cell* 2002, **109**:719-731.
47. Malloy K.J. and Powrie F. "Regulatory T cells in the control of immune pathology". *Nat Immunol* 2001, **2**:816-822.
48. Medzhitov R. and Janeway C. Jr. "Innate immunity". *N Engl J Med* 2003, **343**:338-344.
49. Miller J. and Basten A. "Mechanisms of tolerance to self". *Curr Op Immunol* 1996, **8**:815-821.
50. Moens U., Seternes O.-M., Hey A.W., Silsand Y., Traavik T., Johansen B. and Rervig O.P. "*In vivo* expression of a single viral DNA-binding protein generates systemic lupus erythematosus-related autoimmunity to double-stranded DNA and histones". *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:12393-12397.

51. Möller E. "Mechanisms for induction of autoimmunity in humans". *A Paediatr Suppl* 1998, **424**:16-20.
52. Monneaux F., Dumortier H., Steiner G., Briand J.-P. and Muller S. "Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas^{lpr} and (NZB x NZW)F₁ lupus mice". *Intern Immunol* 2001, **13**:1155-1163.
53. Morel L., Rudofsky U.H., Longmate J.A., Schiffenbauer J. and Wakeland E.K. "Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus". *Immunity* 1994, **1**:219-229.
54. Moreno J.R. *Respuesta Immune y Mecanismos de Autoinmunidad*. Noriega Editores. 1996:79-106.
55. Namura N., Jang I.K., Kole H., Huang H., Haines D. and Gu H. "c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation". *Nat Immunol* 2002, **3**:1192-1199.
56. Odendahl M., Jacobi A., Hansen A., Feist E., Hiepe F., Burmester G.R., Lipsky P.E., Radbruch A. and Dörner T. "Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus". *J Immunol* 2000, **165**:5970-5979.
57. Ohashi P. and DeFranco A. "Making and breaking tolerance". *Curr Op Immunol* 2002, **14**:744-759.
58. Ohtsuka K., Gray J.D., Stimmler M.M., Toro B. and Horwitz D.A. "Decreased production of TGF- β by lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus". *J Immunol* 1998, **160**:2539-2545.
59. Ono M., Okada H., Bolland S., Yanagi S, Kurosaki T and Ravetch J.V. "Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling". *Cell* 1997, **90**:293-301.
60. Panayi G.S. "Autoimmunity in humans". *Hum Exp Toxicol* 1995, **14**:101-103.
61. Parijs L.van and Abbas A.K. "Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off". *Science* 1998, **280**:243-248.
62. Pelanda R., Schwers S, Sonoda E., Torres R.M., Nemazee D. and Rajewsky K. "Receptor editing in a transgenic mouse model site, efficiency and role in B cell tolerance and antibody diversity". *Immunity* 1997, **7**:765-775.
63. Pickering M.C. and Walport M.J. "Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus". *Rheumatol* 2000, **39**:133-141
64. Prodeus A.P., Goerg S., Shen L.M., Pozdnyakova O.O., Chu L., Alicot E.M., Goodnow C.C. and Carroll M.C. "A critical role for complement in maintenance of self-tolerance". *Immunity* 1998, **9**(5):721-731.
65. Ravetch J.V. and Lanier L.L. "Immune inhibitory receptors". *Science* 2000, **290**:84-89.
66. Rose L.M., Latchman D.S. and Isenberg D.A. "Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review". *Brit J Rheumatol* 1997, **36**:158-163.
67. Sakaguchi S. "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance". *Cell* 2000, **101**:455-458.
68. Sakaguchi S. "Policing the regulators". *Nat Immunol* 2001, **2**:283-284.

69. Salvador J.M., Hollander M.C., Nguyen A.T., Kopp J.B., Barisoni L., Moore J.K., Ashwell J.D. and Fornace A.J. "Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndrome". *Immunity* 2002, **16**:499-508.
70. Sayos J., Wu C., Morra M., Wang N., Zhang X., Allen D., van Schaik S., Notarangelo L., Geha R., Roncarolo M.G., *et al* "The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM". *Nature* 1998, **395**:462-469.
71. Seddon B. and Zamoyska R. "Regulation of peripheral T-cell homeostasis by receptor signaling". *Curr Op Immunol* 2003, **15**:321-324.
72. Singer A.L. and Koretzky G.A. "Control of T cell function by positive and negative regulators". *Science* 2002, **296**:1639-1640.
73. Starr R. and Hilton D.J. "Defining control: regulation of dendritic cell activation and immune homeostasis by SOCS1". *Immunity* 2003, **19**:308-309.
74. Stoll M.L. and Gavalchin J. "Systemic lupus erythematosus – messages from experimental models". *Rheumatol* 2000, **39**:18-27.
75. Stratta P., Canavese C., Ciccone G., Santi S. "Correlation between cytomegalovirus infection and Raynaud's phenomenon in lupus nephritis". *Nephron* 1999, **82**:145.
76. Talken B.L., Schäfermeyer K.R., Bailey C.W., Lee D.R. and Hoffman R.W. "T cell epitope mapping of the Smith antigen reveals that highly conserved Smith antigen motifs are the dominant target of T cell immunity in systemic lupus erythematosus". *J Immunol* 2001, **167**:562-568.
77. Tan F.K. and Arnett F.C. "The genetics of lupus". *Curr Op Rheumatol* 1998, **10**:399-408.
78. Tan M., Cohen S., Fries J., Masi T., Mc Shane J., *et al*. "The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus". *Arthritis Rheum* 1982, **25**:1271.
79. Taylor P.R., Carugati A., Fadok V.A., Cook H.T., Andrews M., Carroll M.C., Savill J.S., Henson P.M., Botto M. and Walport M.J. "A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo". *J Exp Med* 2000, **192**:359-366.
80. Theofilopoulos A.N. and Dixon F.J. "Murine models of systemic lupus erythematosus". *Adv Immunol* 1985, **37**:269-368.
81. Theofilopoulos A.N., Dummer W. and Kono D.H. "T cell homeostasis and systemic autoimmunity". *J Clin Invest* 2001. **108**:335-340.
82. Thompson C.B. and Allison J.P. "The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator". *Immunity* 1997, **7**:445-450.
83. Todd J.A., Acha-Orbea H., Bell J.I., Chao N., Fronck Z., Jacob C.O., McDermott M., Sinha A.A., Timmerman L., Steinman L. and McDevitt H.O. "A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity". *Science* 1988, **240**:1003-1009.
84. Tsai C.Y., Wu T.-H., Yu C.-L., Lu J.-Y. and Tsai Y.-Y. "Increased excretions of $\beta(2)$ -microglobulin, IL-6 and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine of patients with active lupus nephritis". *Nephron* 2000, **85**:207.
85. Tsokos G.C. and Kammer G.M. "Molecular aberrations in human systemic lupus erythematosus". *Mol Med Today* 2000, **6**:418-424.

86. Vyse T.J. and Kotzin B.L. "Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus". *Ann Rev Immunol* 1998, **16**:261-92.
87. Vyse T.J. and Todd J.A. "Genetic analysis of autoimmune disease". *Cell* 1996, **85**:311-318.
88. Walker S.E. "The importance of sex hormones in lupus". In *Dubois' Lupus Erythematosus*, edn 5. Edited by Wallace DJ, Hahn BH. Baltimore: Wilkins and Wilkins; 1997:311-322.
89. Walport M.J. "Lupus, DNase and defective disposal of cellular debris". *Nat Genetics* 2000, **25**:135-146.
90. Wakeland E.K., Liu K., Graham R.R. and Behrens T.W. "Delineating the genetics basis of systemic lupus erythematosus". *Immunity* 2001, **15**:397-408.
91. Wang R., Nelson A., Kimachi K., Grey H.M. and Farr A.G. "The role of peptides in thymic positive selection of class II major histocompatibility complex-restricted T cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:3804-3809.
92. Weigle W.O. and Romball C.G. "CD4+ T-cell subsets and cytokines involved in peripheral tolerance". *Immunol Today* 1997, **18**:533-538.