



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

FACULTAD DE MEDICINA

TÍTULO DE LA TESIS PROFESIONAL

**“ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DEL RECEPTOR DE IL-7
MEDIADA POR CBL-B EN CÉLULAS T REGULADORAS
DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO
GENERALIZADO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
DURANTE EL PERIODO DE AGOSTO 2014 A JULIO DE
2015”**

TÍTULO QUE SE OBTIENE CON LA TESIS

MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO

PRESENTA

RIGOBERTO ORTIZ HERNÁNDEZ

DIRECTORES:

ASESOR EXPERTO

DRA. DIANA GÓMEZ MARTÍN

MEDICINA INTERNA Y REUMATOLOGÍA

ASESOR METODOLÓGICO

MTRA. KARLA ROJAS VALDERRAMA

PUEBLA 2016

***La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no
puede ni podrá nunca explicarlo todo...***

***Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece
inexplicable...***

***Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que
se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de
misterio...***

Gregorio Marañón.

DEDICATORIAS

Primeramente a Dios y a la Virgen María.

A mis padres.

A mi hermana y hermano.

A mis abuelos, abuelas, tíos, primos y sobrinos.

Al Doctor Eduardo Gómez Conde.

A mis amigos, amigas y a todas aquellas personas que admiro y respeto profundamente.

~ I ~

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen María, sin ellos nada sería posible.

A mis padres, por darme la vida, por su incondicional apoyo en toda mi formación no solo académica, sino como ser humano, por depositar su confianza en mí, por inspirar mi espíritu y por su gran amor.

A mi hermano y hermana por su apoyo incondicional, por sus ánimos y motivación para seguir adelante.

Al Dr. Eduardo Gómez Conde por ser un gran guía y un fuerte pilar en mi camino médico y personal, por su apoyo y consejos.

A mis asesores, la Dra. Diana Gómez Martín y la Mtra. Karla Rojas Valderrama por ser piezas fundamentales en la terminación de esta tesis.

A mis amigos de laboratorio a la Dra. Ana Barrera Vargas, Dra. Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda, Dra. Yeraldín Esquivel Álvarez, Dra. Jennifer Armenta Rodríguez, el Dr. Jorge Alcocer Varela, Dr. Francisco Javier Merayo Chalico y a todo el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

A toda mi familia por su gran fé y apoyo.

Y a todas aquellas personas que formaron parte directa e indirectamente en la realización de este trabajo.

A todos ellos les agradezco desde el fondo de mi alma y corazón. Para todos ellos hago esta dedicatoria.

INDICE

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
INDICE	III
RESUMEN.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES GENERALES Y ESPECÍFICOS	2
DEFINICIÓN	2
INCIDENCIA Y PREVALENCIA.....	3
MORTALIDAD	4
SUPERVIVENCIA.....	5
EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.....	6
CUADRO CLÍNICO.....	8
DIAGNÓSTICO.....	11
SISTEMA INMUNE	14
TOLERANCIA PERIFÉRICA DEL SISTEMA INMUNE.....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
4. OBJETIVOS	21
4.1. OBJETIVO GENERAL	21
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
6. RESULTADOS.....	26
7. DISCUSIÓN.....	30
8. CONCLUSIONES.....	31
9. BIBLIOGRAFÍA.....	32

RESUMEN

Antecedentes. El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) se caracteriza por múltiples alteraciones en tolerancia periférica. Estudios previos en modelos murinos han mostrado que la resistencia a la supresión por células T reguladoras (Tregs) puede encontrarse alterada en LEG. Sin embargo se desconoce si dicho fenómeno está relacionado con la regulación de la ligasa de ubiquitina Cbl-b y el receptor de IL-7, lo cual es el objetivo del presente trabajo.

Objetivo. Evaluar la concentración de IL-7r ubiquitinado en células T reguladoras de pacientes con LEG

Metodología. Se incluyeron 17 pacientes con LEG y 17 controles sanos ajustados por edad y género. Se aislaron Tregs y células T efectoras (Tefec) de sangre periférica de pacientes con LEG y controles sanos mediante selección con microesferas magnéticas. Se evaluó la expresión de Cbl-b mediante Western Blot y la de CD127 (IL-7r) mediante citometría de flujo. La respuesta supresora fue evaluada mediante ensayos de proliferación cruzados.

Resultados. El SLEDAI promedio para los pacientes activos fue de 20.4 puntos. No se encontraron diferencias en la expresión de CD127 en Tregs de pacientes y controles. En ensayos de proliferación cruzada se encontró una disminución en la supresión en los co-cultivos autólogos de Tefec y Tregs, lo cual se asoció a disminución en la expresión de Cbl-b. Así mismo, encontramos una disminución en la expresión de especies poliubiquitinadas K63 en Tregs y Tefec de pacientes con LEG.

Conclusión. Las Tregs de pacientes con LEG tienen una adecuada función supresora, aunque las Tefec muestran resistencia al efecto supresor por parte de las Tregs, lo cual está asociado a una expresión deficiente de la ligasa de ubiquitina Cbl-b.

1. INTRODUCCIÓN

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

Por su parte, también es importante resaltar que recientemente se ha demostrado que la prevalencia en población catalogada como “hispana” es mayor a la reportada para otros grupos étnicos, llegando a ser de aproximadamente 94 casos por 100 000 individuos (Walsh BT, 2001), mientras que en Estados Unidos se han reportado tasas entre 14.6 y 50.8 por 100 000 individuos. (Danchenko N, 2006)

La clínica de LEG es muy diversa y cuenta con una gran variedad de presentaciones que pueden ir desde síntomas generales, cutáneos hasta lesión a sistemas y aparatos vitales del ser humano, lo cual dificulta un poco más su diagnóstico oportuno. Aunque en la actualidad contamos con estudios de laboratorio que nos pueden diferenciar LEG de otras enfermedades autoinmunes como son los anti-DNA de doble cadena y los anti-Sm. Así mismo el tratamiento va encaminado al tipo de manifestación clínica que presente o desencadene la enfermedad, pero siempre van de la mano los corticoesteroides e inmunosupresores con el objetivo fiel de disminuir las manifestaciones clínicas e incluso apagar la enfermedad.

Desde el punto de vista fisiopatogénico, la señalización persistente a través del receptor de IL-7 en Tregs asociado a un defecto en la ubiquitinación del mismo, puede asociarse a alteraciones en la homeostasis de las Tregs y el desarrollo de un microambiente pro-inflamatorio. Lo anterior se asocia con la inducción y mantenimiento de autoinmunidad en enfermedades tales como el LEG.

2. ANTECEDENTES GENERALES Y ESPECÍFICOS

DEFINICIÓN

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad inflamatoria autoinmune crónica multi-sistémica de etiología desconocida que involucra varios sistemas orgánicos y muestran un amplio espectro de manifestaciones clínicas, inmunológicas y serológicas, en la que el organismo no reconoce su propio cuerpo y comienza a destruir los órganos y funciones vitales.(Khalifa M, 2007)(O'Neill S, 2010)(Millet A, 2009)(A, 2006)(PJ, 2002)(Yu C, 2014)(Doria A, 2010)(Liu CC, 2009) La historia natural de LEG se caracteriza por episodios de recaídas o exacerbaciones, intercalados con remisiones, los resultados son muy variable que va desde la remisión permanente a la muerte. (O'Neill S, 2010)

INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La incidencia y prevalencia de LEG varía de acuerdo a las características de la población: edad, género, raza, origen étnico y nacional. (O'Neill S, 2010)(Siegel M, 1973) Aunque la incidencia y prevalencia de LEG se ha encontrado más alta en los pacientes con ascendencia africana. (O'Neill S, 2010)

En la Unión Europea, la incidencia anual oscila entre 2,2 casos por 100 000 personas por año en Asturias y España (Lopez P, 2003), 5,8 casos por cada 100 000 personas por año en Islandia (Gudmundsson S, 1990) y en los EE.UU. se ha estimado en varios estudios, que van desde 2,2 casos por 100 000 personas por año en el área rural de Rochester (Michet CJ, 1985) a 7,6 en la ciudad de San Francisco. (WJ, 1974)

En el estudio de Hochberg (MC, 1987)de Inglaterra y Gales en 1982, informó una prevalencia de 12,5 casos por 100 000 mujeres de todas las edades, y una prevalencia de 17,7 casos por 100 000 en mujeres de 15 a 64 años. En estudios recientes realizados por Hopkinson (Hopkinson ND, 1994) indican una prevalencia del 24,6 casos por 100 000 personas en Nottingham, y las de Johnson et al. (Uramoto KM, 1999) una prevalencia de 27,7 casos por 100 000 personas. La mayor prevalencia se encuentra en Suecia (Nived O, 1985), en 36,3 casos por 100 000 personas. La prevalencia global en los EE.UU. se ha observado una entre 14,6 casos por 100 000 personas en Nueva York, y 78,5 casos por 100 000 personas en Wisconsin. (Siegel M, 1973)(Michet CJ, 1985) Como el LEG es relativamente poco común, las estimaciones de tasa de incidencia y prevalencia precisas son difíciles de generar.

MORTALIDAD

La mortalidad global de LEG ha incrementado de cuatro a cinco veces, en comparación con la población sana. (Cervera R, 2003) En un estudio de los EE.UU. se observó que los pacientes de raza negra que tienen enfermedad renal, bajas condiciones socioeconómicas, con un curso más agresivo de la enfermedad son los que tienden a tener una mayor mortalidad. (O'Neill S, 2010) En un estudio Europeo indica que las complicaciones de la terapia y manifestaciones trombóticas son cada vez más la causa de muerte en estos pacientes. (O'Neill S, 2010) Sin embargo, la determinación de la causa de muerte en los pacientes con LEG puede ser difícil en muchos casos por la complejidad de esta enfermedad. Además, muchos pacientes presentan afectación multi-sistémica en sus últimos días de la vida (renal, cardíaco, pulmonar, hematológica, etc.), así como otras complicaciones, tales como infecciones. (O'Neill S, 2010) Las infecciones son una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con LEG. (Millet A, 2009)

Sin embargo, tanto la morbilidad y la mortalidad han mejorado en los últimos años por una serie de razones, entre ellas un uso más conservador y razonable de corticoesteroides y regímenes inmunosupresores modificados. Adicionalmente, hay mucha más información sobre los factores alternos tales como la afección de órganos y la aterosclerosis acelerada que puede predecir la morbilidad y la mortalidad en esta enfermedad. (O'Neill S, 2010)

SUPERVIVENCIA

Durante los últimos 40 años o desde la década de los 1950, se ha establecido una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes con LEG. (O'Neill S, 2010)

Estudios anteriores, en 1955 reportaron una tasa de supervivencia de menos del 50% a los 5 años; sin embargo, estudios recientes indican que más del 93% de los pacientes con LEG sobreviven durante 5 años, y más del 85% sobreviven por 10 años. (O'Neill S, 2010) Esto es probablemente debido a una menor prevalencia de la nefropatía, un mejor apoyo de la insuficiencia renal (trasplante y diálisis), un período más reciente de observación, diagnóstico, una atención de salud más homogénea y sistemática, un mejor tratamiento y una riqueza de los antibióticos actualmente disponibles. (O'Neill S, 2010)(M., 1998) Aunque el uso más amplio de inmunosupresores, especialmente los fármacos alquilantes y la mayor supervivencia de los pacientes con insuficiencia renal han hecho un desafío la identificación y el tratamiento adecuado de las infecciones. (M., 1998)

EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El LEG aunque se ha considerado una enfermedad rara, ahora parece ser relativamente común en ciertos grupos de la población. (O'Neill S, 2010)

La teoría que prevalece en el desarrollo de LEG es de etiología multifactorial que involucra la susceptibilidad genética, la edad y los factores hormonales, inmunológicos (deficiencia de factores de complemento, anticuerpos patógenos) y ambientales desencadenantes (Luz UV, fumar, dieta, drogas farmacológicas e infecciones). Sin embargo, ninguno de los factores anteriores es un requisito previo para el desarrollo de LEG. (O'Neill S, 2010)(A, 2006)

El LEG es sustancialmente más común en las mujeres que en los hombres, se estima que su relación es de 9:1 y se presenta con mayor frecuencia en la edad fértil. (O'Neill S, 2010)(PJ, 2002) La edad media de inicio en el grupo Euro-Lupus fue de 29 años y la media de edad a la que se cumplieron los criterios de clasificación del ACR (American College of Rheumatology) fue de 31 años. (Khalifa M, 2007) Una media de edad similar de inicio se ha observado en varios estudios de América del Norte, Europa y América Latina, con una edad de inicio más tardía en pacientes caucásicos. (O'Neill S, 2010)

La tasa de concordancia para LEG entre gemelos monocigóticos y dicigóticos es del 24% y 2%, respectivamente. (Deapen D, 1992) La agregación familiar del LEG apoya un papel para la susceptibilidad genética. (Alarcon D, 2005) Recientes estudios del genoma han identificado una serie de asociaciones con LEG incluyendo STAT4 (transducción de señales y activador de la transcripción 4), IRF5 (factor regulador de interferón) y ITGAM (integrina alfa M). (Liu CC, 2009)(Kelly JA, 2008)(Harley JB, 2008) Más de 20 loci de susceptibilidad se han identificado hasta la fecha, y estos generalmente otorgan un aumento del riesgo de LEG. Estos loci de susceptibilidad dan una idea de la patogénesis de LEG, y vienen siendo bien cubiertos en varias revisiones recientes. (O'Neill S, 2010)

Varios agentes infecciosos han sido implicados en el desarrollo de LEG, y la observación de exacerbaciones en la actividad del LEG después de la infección es compatible con una posible asociación. Uno de ellos es el virus de Epstein-Barr. (O'Neill S, 2010)(Millet A, 2009) Sin embargo, es difícil determinar si las infecciones son una causa de la posterior autoinmunidad, o simplemente un marcador de otros posibles contribuyentes tales como anomalías inmunitarias o factores socioeconómicos asociados a los estilos de vida. (O'Neill S, 2010)(Millet A, 2009)(Doria A C. M., 2008)

CUADRO CLÍNICO

Los síntomas pueden incluir rash malar, fiebre, fatiga, caída de cabello, lesiones o erupciones cutáneas, fotosensibilidad, úlceras orales, artritis, serositis, fenómeno de Raynaud, miositis, alteraciones renales, neurológicas, hematológicas, cardiovasculares. (A, 2006)(Yu C, 2014)

Las principales manifestaciones de LEG durante los 10 años de un estudio prospectivo en una cohorte de Euro-Lupus son ligeramente inferiores a los reportados en varias series grandes de América y Asia en la última década. (O'Neill S, 2010)

**MANIFESTACIONES CLÍNICAS RELACIONADAS A LEG EN UNA CORTE DE
EURO-LUPUS. (O'Neill S, 2010)**

Manifestaciones de LEG	1990-2000(n=1000)	1990-1995(n=1000)	1995-2000(n=840)	p
	No(%)	No(%)	No(%)	
Rash malar	311(31.1)	264(26.4)	144(17.1)	<0.001
Lesiones discoideas	78(7.8)	54(5.4)	50(5.9)	
Lesiones cutáneas subagudas	67(6.7)	46(4.6)	21(2.5)	0.023
Fotosensibilidad	229(22.9)	187(18.7)	112(13.3)	0.002
Ulceras orales	125(12.5)	89(8.9)	61(7.3)	
Artritis	481(48.1)	413(41.3)	240(28.6)	<0.001
Serositis	160(16.0)	129(12.9)	52(6.2)	<0.001
Nefropatía	279(27.9)	222(22.2)	57(6.8)	<0.001
Afectación neurológica	194(19.4)	136(13.6)	97(11.5)	
Trombocitopenia	134(13.4)	95(9.5)	76(9.0)	
Anemia hemolítica	48(4.8)	33(3.3)	24(2.9)	
Fiebre	166(16.6)	139(13.9)	62(7.4)	<0.001
Fenómeno de Raynaud	163(16.3)	132(13.2)	74(8.9)	0.003
Livedo reticularis	70(7.0)	55(5.5)	30(3.6)	
Trombocitosis	92(9.2)	72(7.2)	41(4.9)	0.049
Miositis	43(4.3)	40(4.0)	11(1.3)	<0.001

**COMPARACIÓN DE LAS PRINCIPALES MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE
LEG EN VARIAS SERIES AMPLIAS REPORTADAS EN LAS ÚLTIMAS
DÉCADAS. (O'Neill S, 2010)**

	Petri et al.	Alarcón et al.	Wang et al.	Corte de Euro-lupus
No de pacientes	574	555	539	1000
Área geográfica	América	América	Asia	Europa
Rash malar	331(57.7)	322(58)	410(76.1)	311(31.1)
Lesiones discoides	162(28.2)	107(19.3)	30(5.6)	78(7.8)
Fotosensibilidad	335(58.4)	334(60.2)	222(41.2)	229(22.9)
Ulceras orales	219(38.2)	293(52.8)	185(34.3)	125(12.5)
Artritis	NR	489(88.1)	272(50.5)	481(48.1)
Nefropatía	319(55.6)	223(40.2)	399(74)	279(27.9)
Afectación neurológica	NR	67(12.1)	123(22.8)	194(19.4)
Trombocitopenia	NR	NR	161(29.9)	134(13.4)
Anemia Hemolítica	NR	NR	102(18.9)	48(4.8)

NR. No reportado

DIAGNÓSTICO

No existen criterios diagnósticos de LEG, y los criterios de clasificación del ACR son a menudo mal usados para el diagnóstico; pero esta práctica puede dar lugar a casos perdidos y tratamiento insuficiente. (Font J, 1993)

El ACR propuso en 1982, un conjunto de criterios de clasificación que fueron especialmente diseñados para ser muy específico para los proyectos de investigación, aunque esta también se han usado para realizar su diagnóstico, por ello ha tenido dos modificaciones la última en 1997. (PJ, 2002)(Yu C, 2014)(Doria A Z. M., 2010)(MC., 1997) Fueron actualizados para incluir anticuerpos antifosfolípidos en los criterios. (PJ, 2002)(Yu C, 2014)(Doria A Z. M., 2010)(Font J, 1993) Esta clasificación se basa en 11 criterios. Para los fines de la identificación de pacientes en estudios clínicos, una persona se pueden clasificar con LEG si están presentes 4 o más de los 11 criterios, en serie o simultáneamente, durante cualquier intervalo de observación. (MC., 1997)

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN MODIFICADOS PARA LEG DE 1997. (O'Neill S, 2010)

Criterio de clasificación	
1.Rash malar	Eritema fijo, planas o elevadas, sobre las eminencias malares, tendiendo a escatimar los pliegues nasolabiales.
2.Rash discoides	Eritematosa elevado en parches con escalamiento queratósico adherente y taponamiento folicular; cicatrices atróficas puede ocurrir en las lesiones más viejas.
3.Fotosensibilidad	Erupciones en la piel como resultado de la reacción inusual a la luz del sol, por la historia del paciente o de observación médica.
4.Ulceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea, generalmente sin dolor observada por un médico.
5.Artritis	Artritis no erosiva que participan dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor, hinchazón o derrame.
6.Serocitis Pleuritis Pericarditis	Historia convincente de dolor pleural o roce al oído por un médico o evidencia de derrame pleural. Documentado por ECG o frotamiento o evidencia de derrame pericárdico.
7.Trastorno renal Proteinuria Persistente Cilindros celulares	Proteinuria > 0,5 g/día o superior +++ si no se realiza la cuantificación. Puede ser de color rojo, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.
8.Trastorno neurológico	Ver definiciones ACR de 19 síndromes separados
9.Trastorno hematológico Anemia hemolítica Leucopenia Linfopenia Trombocitopenia	Con reticulocitosis. <4000/mm totales en dos o más ocasiones. <1500/mm totales en dos o más ocasiones. <100 000/mm en ausencia de fármacos ofensivos.
10.Trastorno inmunológico Anti-DNA Anti-Sm Anticuerpos anti fosfolípidos positivos	Anticuerpo para ADN nativo en títulos anormales. Presencia de anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm. Concentración sérica anormal de anticuerpos anticardiolipina IgG o IgM. Un resultado positivo de la prueba de anticoagulante lúpico utilizando un método estándar. Una prueba serológica de falso positivo para la sífilis, se sabe que es positivo para al menos 6 meses y confirmado por inmovilización del Treponema pallidum o la prueba de absorción de anticuerpos fluorescentes para Treponema.
11.Anticuerpos antinucleares	Título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en cualquier punto en el tiempo, y en ausencia de medicamentos conocidos por estar asociados con el síndrome de "lupus inducido por drogas".

El diagnóstico de LEG está basado en el reconocimiento de un total de patrones clínicos y anormalidades de laboratorio, incluyendo cambios histológicos e inmunoquímicos en órganos como riñón y piel. (PJ, 2002) La presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) es el marcador de las enfermedades reumatológicas autoinmunes, como lo es en el LEG.(PJ, 2002) La introducción de pruebas serológicas para detectar perfiles típicos de anticuerpos en el lupus han

revolucionado el diagnóstico e incrementado la habilidad para diagnosticar casos leves. (PJ, 2002)

Los ANA son encontrados en enfermedades autoinmunes órgano-específicas y otros entornos clínicos tales como infecciones y desórdenes linfoproliferativos. La frecuencia de ANA en personas normales es alta en mujeres, incrementa con la edad y al menos 25% de las mujeres sanas arriba de 60 años son positivas. Aunque los anticuerpos anti DNA de doble cadena y los anti-Sm son los más específicos para LEG. (PJ, 2002)(Yu C, 2014)(Liu CC, 2009)

LA FRECUENCIA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN LEG. (PJ, 2002)

Anticuerpo	Frecuencia	Asociación Clínica
ANA para IMF	98%	No específico, además se puede encontrar en: Otras enfermedades reumatológicas sistémicas (ej. Escleroderma 98%, Síndrome de Sjogren 80%, JIA 70%, artritis reumatoide 50%). Autoinmunidad órgano-específica (ej. Colangitis autoinmune primaria 100%, hepatitis autoinmune 70%, miastenia gravis 50%, enfermedad tiroidea autoinmune 45%). Otras condiciones (ej. macroglobulinemia de Waldenstrom 20%, endocarditis bacteriana subaguda 20%, mononucleosis infecciosa 15%, lepra 15%) Población normal (adultos 15%, niños 8%).
Anti-DNA	70%	Nefritis lúpica
Anti- Sm	10%-25%	Vasculitis, Lupus de SNC
Anti-UIRNP	30%	Síndrome de Raynaud, dedos hinchados, artritis, miositis, enfermedades de tejido conectivo mixto
Anti-Ro	40%	Fotosensibilidad, lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus neonatal, bloqueo de corazón, síndrome de Sjogren
Anti-La	15%	Igual que anti-Ro
Anti-rRNP	15%	Lupus de SNC(depresión y psicosis)

SISTEMA INMUNE

El sistema inmune de los pacientes con LEG ataca su propio organismo, a menudo son incapaces de montar una respuesta efectiva contra agentes externos. Presentan una disfunción tanto de la inmunidad innata y adquirida; (Millet A, 2009)(M., 1998)(Barrera A, 2014) tales como una quimiotaxis defectuosa, defectos en la actividad fagocítica, y la síntesis de citocinas. También hay alteraciones en la acción antimicrobiana de las diferentes subpoblaciones celulares, tales como neutrófilos, linfocitos T y células natural killer. (Barrera A, 2014) Los pacientes con LEG presentan demasiadas células B hiperactivas y se caracterizan por tener hipergamaglobulinemia y títulos de anticuerpos elevados a múltiples virus y otros patógenos. (M., 1998)

La predisposición genética en la disfunción inmune, se ha identificado que existen ciertos trastornos genéticos que afectan el sistema del complemento los cuales han sido identificados como factores de riesgo para infecciones en pacientes con LEG. Las deficiencias de factores que intervienen tempranamente en la ruta clásica del complemento (se ha identificado en pacientes con LEG cierta relación con C3) y la deficiencia de lectina de unión a manosa, favorece la infección por *Streptococcus pneumoniae* y multiplican el riesgo de hospitalización por un factor de cuatro. La deficiencia de fracciones del complemento terminales aumenta el riesgo de la infección por *Neisseria*. (Millet A, 2009) Niveles bajos de una fracción C3 del complemento; por ejemplo, detectada durante una infección se asocia con un mayor riesgo de hospitalización durante el año siguiente y así mismo a resistencias bacterianas. (Millet A, 2009)(Doria A C. M., 2008)(Barrera A, 2014)(BJ., 2002)(Arce CA, 2012)

Los neutrófilos de los pacientes con LEG muestran un deficiente reconocimiento microbiano, fagocitosis y metabolismo oxidativo. (Millet A, 2009)(Barrera A, 2014) Los macrófagos muestran fagocitosis defectuosa, posiblemente debido a la producción de anticuerpos anti-FcγR y baja producción de TNF. (Millet A, 2009)(Barrera A, 2014)

Durante las exacerbaciones del LEG, los linfocitos T CD4 muestran reactividad reducida a los antígenos virales. Los pacientes con LEG son más propensos a tener asplenia funcional, exponiéndolos a un mayor riesgo de infección por bacterias encapsuladas. (Millet A, 2009)

El Índice de actividad de la enfermedad de LEG (SLEDAI) se correlaciona con las disfunciones inmunes mencionadas y, por tanto, con el riesgo de infección. Una mayor puntuación en el SLEDAI ha sido asociada con una mayor frecuencia de infecciones y hospitalizaciones debido a complicaciones. (Millet A, 2009)(Barrera A, 2014)

TOLERANCIA PERIFÉRICA DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune ha desarrollado múltiples mecanismos de tolerancia periférica, los cuales están encaminados a contender contra las diversas células T y B autoreactivas que logran escapar a los mecanismos de tolerancia central que se llevan a cabo dentro del timo (DL, 2010), con el objetivo de evitar el desarrollo de patología autoinmune. Dentro de estos mecanismos, se encuentran la anergia (RH, 2003), y el efecto supresor mediado a través de Tregs (Sakaguchi S, 2010) (Wing K, 2010), entre otros.

Las Tregs en humanos se caracterizan por la síntesis de diversas moléculas, dentro de las cuales se destacan la cadena α del receptor de IL-2 (CD25), así como el factor de transcripción FOXP3 (Forkhead box P3). (de St Groth BF, 2011) Esta subpoblación celular se considera indispensable para el mantenimiento de la tolerancia periférica y la homeostasis del sistema inmune.

Las Tregs pueden dividirse en naturales, es decir provenientes del timo e inducibles (Miyara M, 2011), que pueden distinguirse con base en sus funciones y características fenotípicas. Desde el punto de vista funcional, las Tregs se caracterizan por la capacidad de ejercer un efecto supresor tanto de la proliferación como de la respuesta efectora de diversas subpoblaciones celulares, tales como linfocitos T CD4+, CD8+, y células NK. (Jonuleit H, 2001) (Levings MK, 2001)

Las Tregs ejercen su efecto supresor a través de diversos mecanismos, que incluyen la producción de citocinas supresoras, (i.e. IL-10 (Rubtsov YP, 2008), IL-35 (Collison LW, 2007) y TGF- β (Nakamura K, 2001)); citolisis mediada por granzimas (Grossman WJ, 2004); alteraciones metabólicas como muerte por deprivación de citocinas y mediadores bioquímicos como la adenosina (Oberle N, 2007); e inhibición de la maduración y función de células dendríticas (Tadokoro CE, 2006). Asimismo, se ha demostrado el requerimiento de la síntesis de FOXP3 en Tregs para su función supresora tanto in vitro como in vivo. (Campbell DJ, 2011)(Hori S, 2004)(Jang E, 2011)

Las alteraciones tanto cuantitativas como funcionales de la supboblación de Tregs se han asociado al desarrollo y/o mantenimiento de diversas patologías autoinmunes, tanto órgano específicas como sistémicas, en modelos murinos y en humanos. (Miyara M, 2011) (Fehervari Z, 2005) (Hobeika AC, 2011) (Kahaly GJ, 2011) (Kollins D, 2011) (Koyabu M, 2010) (La Scaleia R, 2010) (Lourenco EV, 2011)

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

Los mecanismos de tolerancia periférica, como la inducción de anergia y la función de las Tregs, pueden ser modulados por el sistema de ubiquitinación. (Gomez D, 2008) Este sistema comprende la conjugación de ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada, a un sustrato protéico, y es en sí un mecanismo de modificación postraduccional de alta especificidad, que puede ser dependiente e independiente de proteólisis.

El mecanismo de conjugación ubiquitina-proteína implica una secuencia de reacciones enzimáticas, que involucran tres diferentes tipos de enzimas: E1 (activadora), enzima conjugadora (E2) y, finalmente una ligasa de ubiquitina (E3) la cual transfiere la ubiquitina activada a un residuo de lisina en la proteína blanco, siendo este último paso el que brinda la especificidad al sistema. (Ciechanover A, 2000) (CM., 2001)

Recientemente se ha destacado el papel de ligasas de ubiquitina (E3), tales como Cbl-b (Casitas B lymphoma), GRAIL (Gene Related to Anergy in Lymphocytes) e Itch, cuyos genes forman parte del programa inducido por calcio/calcineurina. (Macian F, 2002) (YC., 2004) (Heissmeyer V, 2004)

La concentración de Cbl-b induce anergia al producir una disminución en la fosforilación de la fosfolipasa C γ -1 (PLC γ -1). Lo anterior altera las vías de

señalización dependientes de calcio (Jeon MS, 2004) y la formación de una sinapsis inmunológica efectiva. (Wells AD, 2003) (Naramura M, 2002)

La ausencia de Cbl-b, como se observa en el ratón Cbl-b $-/-$, se asocia al desarrollo de autoinmunidad espontánea e inmunopatología inducida por un reto antigénico. (Bachmaier K, 2000) (Chiang YJ, 2000)

El LEG (Bottomley MJ, 2005) es una enfermedad autoinmune crónica, que se considera el prototipo de las enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado que los pacientes con LEG tienen defectos en los mecanismos de tolerancia periférica. (Tsokos GC, 1999) (Tsokos GC M. J., 2003)

Las células T de los pacientes con LEG tienen defectos claros en los mecanismos de activación. Muestran evidencia que indica un estado parcial de activación, pero no se activan en forma óptima si son estimuladas in vitro. (Tsokos GC W. H., 2000)

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que las células T CD4⁺ de pacientes con LEG muestran un fenotipo de resistencia a anergia, el cual se asocia a la deficiencia en la síntesis la ligasa de ubiquitina Cbl-b. Mediante ensayos de transfección in vitro se demostró que la sobre-síntesis de Cbl-b en las células T de los pacientes con LEG era capaz de revertir el fenotipo de resistencia a anergia en términos de la señalización a través del receptor de células T, modificando la síntesis de p-MAPK y p-Akt. (Gomez D I. M., 2013)

Asimismo, nuestro grupo y otros han demostrado la presencia de resistencia a la supresión por Tregs en pacientes con LEG, independientemente de la actividad de la enfermedad (Vargas-Rojas MI, 2008) (Venigalla RK, 2008), y de la ausencia o presencia de linfopenia. (Gomez D D. M., 2011)

Por otro lado, la interleucina-7 (IL-7) es una citocina hematopoyética, que tiene como principal función la estimulación de los linfocitos para su supervivencia y expansión de sus precursores inmaduros. El receptor de la IL-7 (IL-7r), está formado por una única cadena α de unión a la IL-7, asociado a la cadena γ y la

cual es común a otros receptores de interleucinas como 2, 4 y 15. Los modelos murinos deficientes en IL-7 o su receptor se caracterizan por presentar linfopenia y en alteraciones en múltiples subpoblaciones de linfocitos T, incluyendo Tregs.

En términos de la diferenciación linfocitaria se ha reportado que la IL-7 es esencial para la supervivencia de los linfocitos T vírgenes maduros y de memoria, en especial CD4+ de memoria, los cuales expresan elevadas cantidades de IL-7r. Recientemente se ha reportado que la IL-7 es también una citocina capaz de regular diversas subpoblaciones de Tregs mediante la señalización a través de CD39. (Bayer AL, 2008) (Younas M, 2013) IL-7 es capaz de regular negativamente a las células Tregs, favoreciendo su conversión hacia células Th17.

El receptor de IL-7 puede ser regulado por ubiquitinación mediada por ligasas de ubiquitina de la familia Cbl en células T CD4+, sin embargo se desconoce si esto puede presentarse en Tregs y por lo tanto alterar su diferenciación y función en patologías autoinmunes, tales como LEG.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El LEG es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por diversas alteraciones en los mecanismos de tolerancia periférica. Se han descrito múltiples defectos en los mecanismos de activación de linfocitos T, así como alteraciones cuantitativas y funcionales tanto de Tefec como Tregs. Se desconoce a detalle cuáles son los defectos que subyacen a dichas alteraciones funcionales. Específicamente, se desconoce si existe alteración en la regulación del receptor de IL-7 mediada por la ligasa de ubiquitina Cbl-b en Tregs de pacientes con LEG.

La deficiencia en la ubiquitinación de IL-7r asociada al defecto en la síntesis de la ligasa de ubiquitina Cbl-b en Tregs, puede favorecer alteraciones en la diferenciación de esta subpoblación, lo cual puede tener un papel fisiopatogénico en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso generalizado.

¿Existe aumento en la síntesis del receptor de IL-7 asociado a un defecto en la ubiquitinación del mismo mediada por Cbl-b en células T reguladoras de pacientes con LEG, en comparación con células T de controles sanos?

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la concentración de IL-7r ubicuitinado en Tregs de pacientes con LEG.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Evaluar la concentración de IL-7r ubicuitinado en Tregs purificadas de pacientes con LEG.

4.2.2. Evaluar la concentración de la proteína Cbl-b en Tregs purificadas de pacientes con LEG.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Es un diseño de estudio analítico, observacional, transversal, retrospectivo y unicéntrico. El presente estudio se llevó a cabo en el Departamento de Reumatología e Inmunología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). En el cual se revisaron expedientes de la consulta externa de Reumatología del INCMNSZ para obtener pacientes en remisión (SLEDAI 0), se monitorizó el área de urgencias y pre-consulta para la obtención de pacientes activos (SLEDAI > 6). Así mismo se buscó una persona sana (control) pareado por edad y género. Se obtuvo una muestra de sangre de 60 ml a 100 ml por cada paciente y control. Se procesó la sangre de paciente y control al mismo tiempo hasta la obtención de células T CD4+, reguladoras y efectoras. Las células se contaron y se procesaron según el número de células vivas. Se analizaron los resultados. Se evaluó los resultados y se publicaron las conclusiones.

La unidad de población fueron pacientes con registro dentro del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y nutrición Salvador Zubirán. México DF.

La selección de la muestra fueron paciente del INCMNSZ con diagnóstico de LEG en remisión sin tratamiento con corticoesteroides e inmunosupresores en los 12 meses previos y LEG activos sin tratamiento durante un mes previo.

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes con registro dentro del INCMNSZ.
- Pacientes de 18 a 45 años de edad.
- Sin importar el género.
- Pacientes con diagnóstico de LEG según los criterios del Colegio Americano de Reumatología.

- Se encuentren en remisión (SLEDAI 0) ó activos (SLEDAI > 6).
- Sin antecedente de tratamiento con corticoesteroides e inmunosupresores en los 12 meses previos a la toma de muestra para pacientes en remisión y 1 mes para pacientes activos.
- Pacientes que aceptaron participar de forma voluntaria en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado.

De los controles

- Personas sanas.
- Entre 18 a 45 años de edad.
- Sin antecedentes heredo familiares de LEG.
- Personas que aceptaron participar de forma voluntaria en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes sin registro dentro del INCMNSZ.
- Pacientes con diagnóstico de otra enfermedad autoinmune.
- Con antecedente de tratamiento con corticoesteroides e inmunosupresores en los 12 meses previos a la toma de muestra para pacientes en remisión y 1 mes para pacientes activos.
- Pacientes que no aceptaron participar de forma voluntaria en el estudio y no firmaron la carta de consentimiento informado.

Los criterios de eliminación fueron:

- Diagnóstico de embarazo.
- Pacientes con diagnóstico de sobre posición de enfermedades autoinmunes.
- Pacientes sin diagnóstico de LEG.
- Diagnóstico de patologías que pueden alterar el número de Tregs, tales como diabetes mellitus, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide.
- Diagnóstico de infecciones virales crónicas.

El diseño y tipo de estudio fue determinístico. El estudio se realizó en un total de 17 pacientes con diagnóstico de LEG que se detectaron en el departamento de inmunología y reumatología del INCMNSZ durante agosto 2014 a julio 2015.

Se procedió a revisar expedientes de la consulta externa de Reumatología del INCMNSZ para la recolección de pacientes en remisión y se monitorizó el área de urgencias y pre-consulta para localizar pacientes activos.

Se estudiaron 17 pacientes mayores de 18 años, con LEG diagnosticado en base a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología provenientes del servicio de consulta externa de reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se obtuvo información clínica relevante a partir de su expediente. Se registró la actividad de su enfermedad el día de la toma de la muestra de acuerdo al índice SLEDAI.

Obtención de células reguladoras. A cada sujeto se le extrajeron 60 ml de sangre venosa periférica con jeringas de 20 ml que fue anticoagulada con heparina. Se separaron las células mononucleares por centrifugación a través de gradientes de densidad (Ficoll-Hypaque). Las células CD4+ se

obtuvieron por medio de selección negativa mediante microesferas magnéticas (pureza mayor a 95%). Posteriormente para la obtención de Tregs se seleccionaron de esta población aquellas CD25+ mediante selección positiva con microesferas magnéticas (pureza 90%).

Concentración de la proteína Cbl-b. Se obtuvieron lisados de las Tregs purificadas como se describió previamente. Se realizó Western Blot para Cbl-b y se normalizó con β -actina.

Concentración del receptor de IL-7 ubiquitinado. Se realizó citometría de flujo para IL-7r proveniente de células T reguladora y posteriormente se evaluó su ubiquitinación mediante Western Blot para especies poliubiquitinadas (FK1). La respuesta supresora de células T fue evaluada mediante ensayos de proliferación cruzados.

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

Se espera que el 100% de los controles sanos no tenga ninguna alteración en la señalización. Así mismo se espera que estén alterados en los pacientes con LEG.

6. RESULTADOS

Se reclutaron 17 pacientes y 17 controles sanos ajustados por edad y género. De los 17 pacientes incluidos, 12 fueron pacientes con LEG activo sin tratamiento inmunosupresor. El índice de actividad promedio (SLEDAI) para los pacientes activos fue de 20.4 puntos. (Fig. 1)

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON LEG

	Media
Edad (años)	35.2
Mujeres	14/3
Tiempo desde el diagnóstico (años)	5.6
Tiempo de remisión (años)	4.5
SLEDAI (puntos)	20.4

Fig. 1 Base de datos de pacientes con LEG activo e inactivo del INCMNSZ

La expresión de CD127 (IL7R) fue evaluada mediante citometría de flujo en las Tregs de pacientes con LEG y controles sanos, sin encontrar diferencias, ni en el porcentaje de células que expresaban CD127, ni en la intensidad media de fluorescencia de la misma. Tanto en pacientes con LEG como en controles sanos, la expresión de CD127 en Tregs fue baja, en comparación con las Tefec en ambos grupos.

Así mismo, se realizaron ensayos de proliferación cruzados para evaluar el fenómeno de resistencia a anergia. En dichos ensayos, se documentó una

disminución en el porcentaje de supresión en los co-cultivos autólogos de Tefec y Tregs de pacientes con LEG vs controles sanos (30% vs 80%, $p=0.022$). Sin embargo, en los co-cultivos alogénicos no se encontraron diferencias en el porcentaje de supresión (78% vs 81%, $p= 0.12$), lo cual demuestra que las Tregs de pacientes con LEG tienen una adecuada función supresora, aunado a un defecto en la capacidad de las Tefec a ser suprimidas por las Tregs. (Fig. 2)

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CRUZADA EN CÉLULAS T REGULADORAS Y CÉLULAS TEFECTORAS DE PACIENTES CON LEG Y CONTROLES.

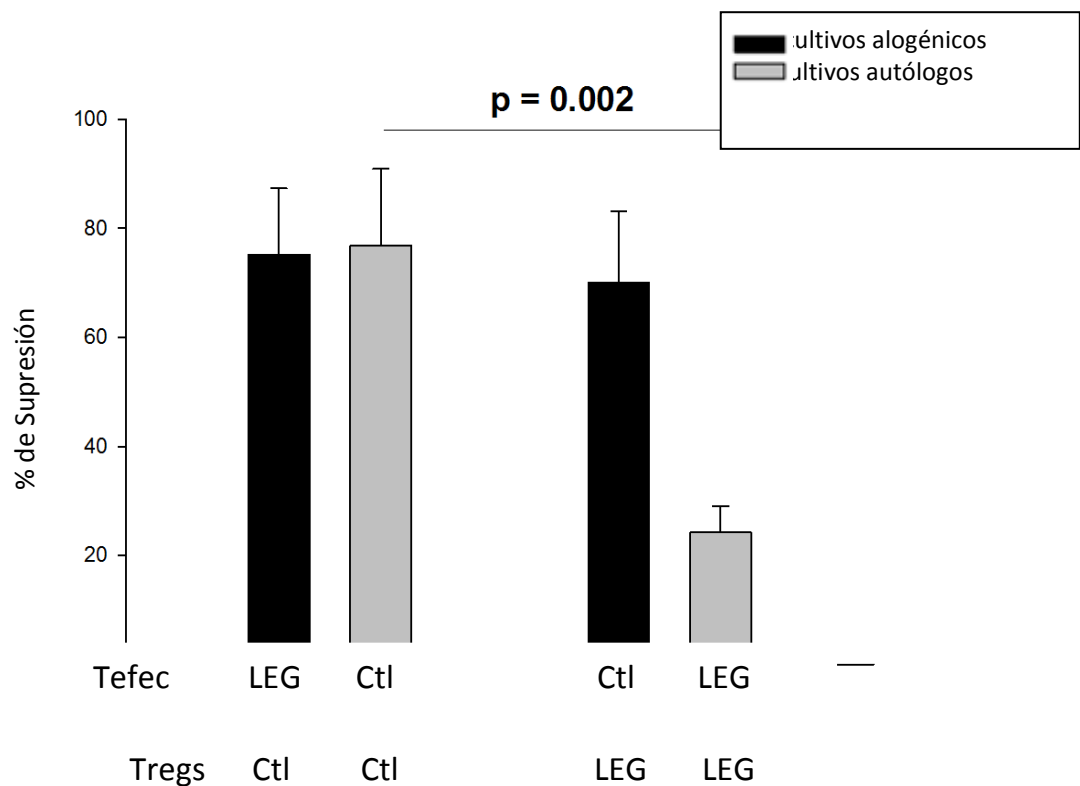


Fig.2 Base de muestras de células T de pacientes con LEG y controles con citómetro de flujo ACCURI.

Así mismo encontramos disminución en la expresión de la proteína Cbl-b en Tregs (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) de pacientes con LEG en comparación con controles sanos (1.3±1.0 vs 2.8±1.8, p=0.002). (Fig. 3) (Fig. 4) Lo anterior se asoció a su vez a la presencia del fenómeno de resistencia a la supresión en los ensayos de proliferación (r=0.553, p=0.041).

EXPRESIÓN DE CBL-B EN CÉLULAS T REGULADORAS DE PACIENTES CON LEG Y CONTROLES.

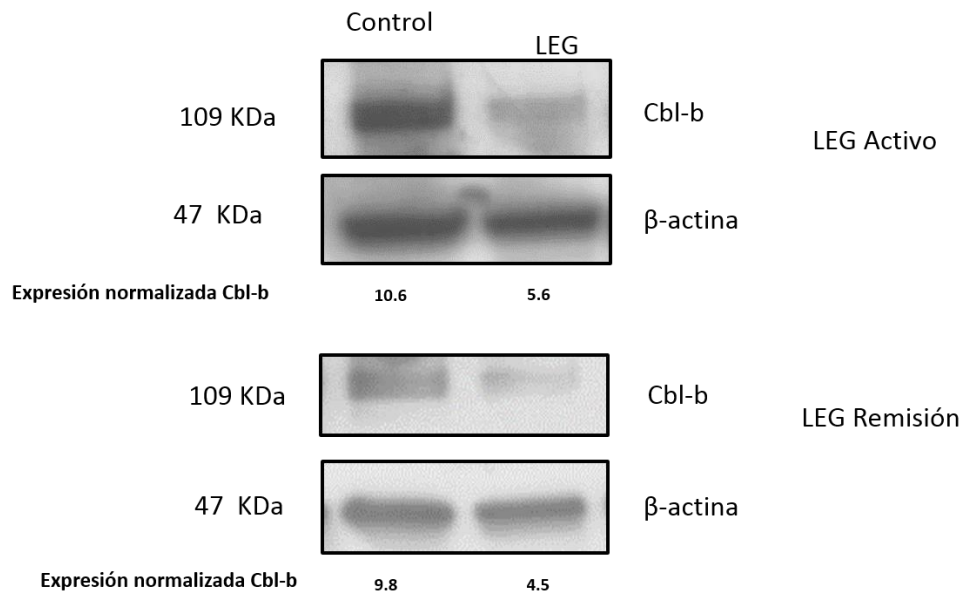


Fig. 3 Base de muestras de células T reguladoras de pacientes con LEG y controles con método de Western Blot.

EXPRESIÓN NORMALIZADA DE LA PROTEÍNA CBL-B

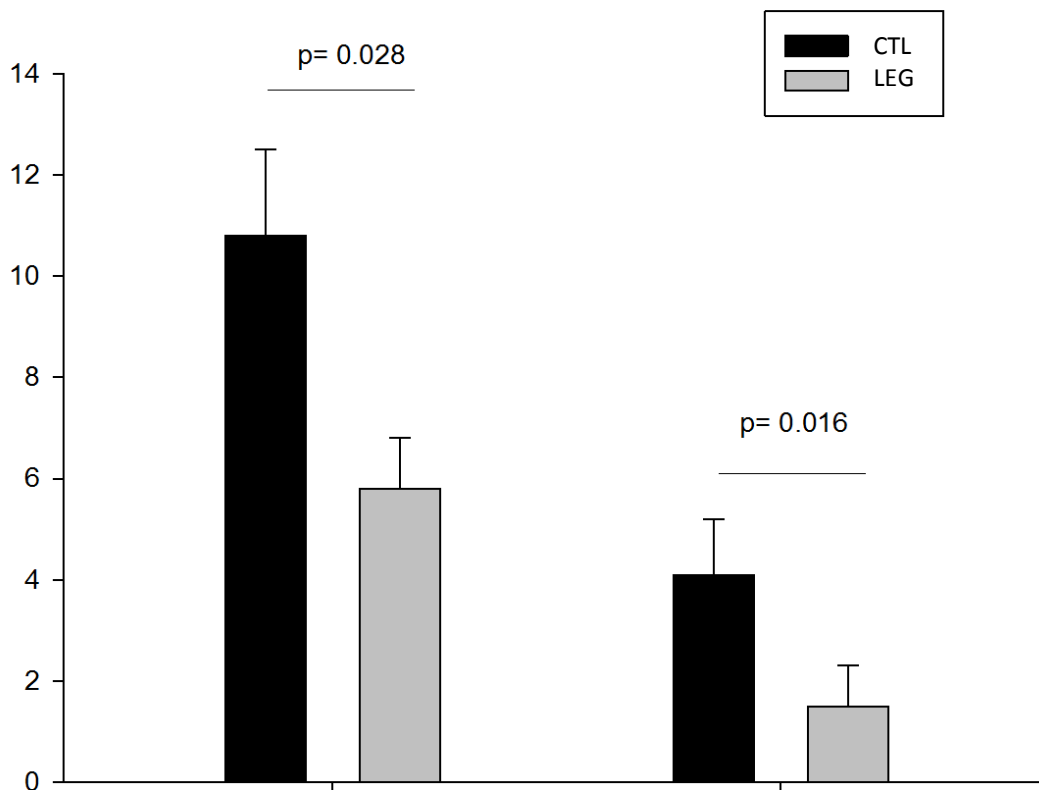


Fig. 4 Base de muestras de células T de pacientes con LEG y controles con citómetro de flujo ACCURI

No se encontraron diferencias significativas entre aquellos pacientes que se encontraban en remisión y aquellos con enfermedad activa.

Se realizó WB para especies poliubicitinadas (K48 y K63) en los lisados de Tregs y Tefec de pacientes y controles, en las que se encontró disminución de la expresión de especies poliubicitinadas en la lisina63 (K63) en las Tregs y Tefec de pacientes con LEG en comparación con controles sanos.

7. DISCUSIÓN

El fenómeno de resistencia a la supresión se ha relacionado con diversas patologías autoinmunes, tanto en modelos murinos como en humanos. En el modelo murino deficiente de Cbl-b se ha documentado la presencia de dicho fenómeno. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en el modelo murino en cuanto a la presencia de la resistencia a la supresión en el contexto de la deficiencia de la ligasa de ubiquitina Cbl-b. Recientemente se ha reportado que Cbl-b es capaz de promover la generación de Tregs inducibles, al modificar el umbral de activación del receptor de células T y la inducción de FOXP3. Dicha regulación es a su vez mediada a través de Akt. Nuestros resultados sugieren que la ligasa de ubiquitina Cbl-b puede regular el fenómeno de resistencia a la supresión al modular la expresión de proteínas poliubiquitinadas. En estudios previos de nuestro grupo de investigación y otros grupos se ha demostrado que p85PI3K es sustrato de Cbl-b, tanto en Tefec como Tregs, lo cual sugiere que la señalización a través de Akt es clave para el desarrollo de la resistencia a la supresión en el contexto de deficiencia de Cbl-b en pacientes con LEG.

Así mismo, nuestros resultados sugieren que no existe alteración en la expresión de CD127 en Tregs de pacientes con LEG, por lo que dicho receptor no está asociado a la resistencia a la supresión mostrada en pacientes con LEG.

8. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que las Tefec muestran resistencia al efecto supresor por parte de las Tregs, lo cual está asociado a una expresión deficiente de la ligasa de ubiquitina Cbl-b. Nuestros datos sugieren que la ligasa de ubiquitina Cbl-b es capaz de regular la interacción entre Tefec y Tregs, específicamente el fenómeno de resistencia a la supresión en pacientes con LEG. Así mismo, esta expresión deficiente de Cbl-b se asocia a cambios en el perfil de ubiquitinación, con disminución de las especies poliubiquitinadas en la lisina 63 (K63).

9. BIBLIOGRAFÍA

- A, S. (2006). Complex syndromes, ambivalent diagnosis, and existential uncertainty: The case of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Social Science & Medicine*, 1549–1559.
- Alarcon D, A. M. (2005). Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis & Rheumatism*, 1138–1147.
- Arce CA, V. P. (2012). Infections and Systemic Lupus Erythematosus. *Systemic Lupus Erythematosus*, 407-428.
- Bachmaier K, K. C.-d.-S. (2000). Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature*, 211-216.
- Barrera A, G. D. (2014). Risk Factors for Drug-resistant Bloodstream Infections in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*, 1311-1316.
- Bayer AL, L. J. (2008). A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology*, 225-234.
- BJ., F. (2002). Infectious diseases in systemic lupus erythematosus: risk factors, management and prophylaxis. *Best practice and research clinical rheumatology*, 281-291.
- Bottomley MJ, S. G. (2005). NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune 15 polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem*, 11505-11512.
- Campbell DJ, K. M. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3(+) regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 119-130.
- Cervera R, K. M. (2003). Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine*, 299–308.

- Chiang YJ, K. H. (2000). Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature*, 216-220.
- Ciechanover A, O. A. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, 442-451.
- CM., P. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 503-533.
- Collison LW, W. C. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 566-569.
- Danchenko N, S. J. (2006). Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, 308-318.
- de St Groth BF, Z. E. (2011). Flow Cytometric Detection of Human Regulatory T Cells. *Methods Mol Biol*, 263-279.
- Deapen D, E. A. (1992). A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 311-318.
- DL, M. (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*, 21-27.
- Doria A, C. M. (2008). Infections as triggers and complications of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*, 24-28.
- Doria A, Z. M. (2010). SLE diagnosis and treatment: When early is early. *Autoimmunity Reviews*, 55-60.
- Fehervari Z, S. S. (2005). CD4+ regulatory cells as a potential immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1647-1661.
- Font J, C. R. (1993). 1982 revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus—ten years later. *Lupus*, 339-341.
- Gomez D, D. M. (2008). Ubiquitination system and autoimmunity: the bridge towards the modulation of the immune response. *Autoimmun Rev*, 284-290.

- Gomez D, D. M. (2011). Quantitative and functional profiles of CD4(+) lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Clin Exp Immunol*.
- Gomez D, I. M. (2013). Casitas B lineage lymphoma b is a key regulator of peripheral tolerance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 1032-1042.
- Grossman WJ, V. J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 2840-2848.
- Gudmundsson S, S. K. (1990). Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in an unselected population. *Journal of Rheumatology*, 1162–1167.
- Harley JB, A.-R. M. (2008). Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK23, KIAA1542 and other loci. *Nature Genetics*, 204–210.
- Heissmeyer V, M. F. (2004). Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol*, 255-265.
- Hobeika AC, M. M. (2011). 14 Depletion of human regulatory T cells. *Methods Mol Biol*, 219-231.
- Hopkinson ND, D. M. (1994). Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic675–680.
- Hori S, S. S. (2004). Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect*, 745-751.
- Jang E, C. W. (2011). Foxp3+ regulatory T cells control humoral autoimmunity by suppressing the development of long-lived plasma cells. *J Immunol*, 1546-1553.
- Jeon MS, A. A. (2004). Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction. *Immunity*, 167-177.

- Jonuleit H, S. E. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 1285-1294.
- Kahaly GJ, S. O.-S. (2011). Regulatory T-cells in graves' orbitopathy: baseline findings and immunomodulation by anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 422-429.
- Kelly JA, K. J. (2008). Interferon regulatory factor-5 is genetically associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. *Genes & Immunity*, 187–194.
- Khalifa M, K. N. (2007). Infection in systemic lupus erythematosus. *Médecine et maladies infectieuses*, 792–795.
- Kollins D, S. B. (2011). FOXP3+ regulatory T-cells in renal allografts: correlation with long-term graft function and acute rejection. *Clin Nephrol*, 91-100.
- Koyabu M, U. K. (2010). Analysis of regulatory T cells and IgG4-positive plasma cells among patients of IgG4-related sclerosing cholangitis and autoimmune liver diseases. *J Gastroenterol*, 732-741.
- La Scaleia R, M. S. (2010). Peripheral and intestinal CD4+ T cells with a regulatory phenotype in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 563-572.
- Levings MK, S. R. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*, 1295-1302.
- Liu CC, A. J. (2009). The search for lupus biomarkers. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 507–523.
- Lopez P, M. L. (2003). Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus*, 860–865.
- Lourenco EV, L. C. (2011). Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity*, 33-42.
- M., P. (1998). Infection in systemic lupus erythematosus. *Infectious arthritis*, 423-456.

- Macian F, G.-C. F. (2002). Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell*, 719-731.
- MC, H. (1987). Prevalence of systemic lupus erythematosus in England and Wales, 1981-2. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 664–666.
- MC., H. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 1725.
- Michet CJ, M. C. (1985). Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissues disease in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc*, 105–113.
- Millet A, D. O. (2009). Systemic lupus erythematosus and vaccination. *European Journal of Internal Medicine*, 236–241.
- Miyara M, S. S. (2011). Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol*.
- Nakamura K, K. A. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 629-644.
- Naramura M, J. I. (2002). c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol*, 1192-1199.
- Nived O, S. G. (1985). Systemic lupus erythematosus in an adult population in southern Sweden: incidence, prevalence and validity of ARA revised classification criteria. *British Journal of Rheumatology*, Nived O, Sturfelt G, Wollheim F. Systemic lupus erythematosus in an adult population in south147–154.
- O’Neill S, C. R. (2010). Systemic lupus erythematosus. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 841–855.
- Oberle N, E. N.-P. (2007). Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol*, 3578-3587.

- PJ, M. (2002). Is it SLE? *Best practice and research clinical rheumatology*, 167-180.
- RH, S. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol*, 305-334.
- Rubtsov YP, R. J. (2008). Regulatory T cell derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 546-558.
- Sakaguchi S, M. M. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 490-500.
- Siegel M, L. S. (1973). The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Seminars in Arthritis & Rheumatism*, 1-54.
- Tadokoro CE, S. G. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 505-511.
- Tsokos GC, L. S. (1999). Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today*, 119-124.
- Tsokos GC, M. J. (2003). T cell abnormalities in human and mouse lupus: intrinsic and extrinsic. *Curr Opin Rheumatol*, 542-547.
- Tsokos GC, W. H. (2000). Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol*, 355-363.
- Uramoto KM, M. J. (1999). Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis & Rheumatism*, 46-50.
- Vargas-Rojas MI, C. J.-P.-V. (2008). Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus*, 289-294.
- Venigalla RK, T. T. (2008). Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2120-2130.
- Walsh BT, P. C. (2001). SLE in a United States-Mexico Border Community. *J Clin Rheumatol*, 3-9.

- Wells AD, L. Q. (2003). Regulation of T cell activation and tolerance by phospholipase C gamma-1-dependent integrin avidity modulation. *J Immunol*, 4127-4133.
- Wing K, S. S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*, 7-13.
- WJ, F. (1974). Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Archives of Internal Medicine*, 1027–1035.
- YC., L. (2004). Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol*, 81-127.
- Younas M, H. S. (2013). IL-7 Modulates In Vitro and In Vivo Human Memory T Regulatory Cell Functions through the CD39/ATP Axis. *Journal of immunology*, 3161-3168.
- Yu C, G. M. (2014). Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 48-49:10-13.

Para las personas creyentes, Dios esta al principio...

Para los científicos está el final de todas sus reflexiones...

Max Planck