



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LAS BALSAS LIPÍDICAS EN  
LINFOCITOS T ESTIMULADOS VÍA TCR/CD3-CD28, DE  
PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Noymar Luque como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutores: Nursamaa Abdoel, PhD

Vincenza Cervino, PhD

CARACAS, VENEZUELA  
MAYO - 2015



## RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria que se manifiesta predominantemente en el género femenino. Su etiología es desconocida y está caracterizada por la producción de altos niveles de autoanticuerpos contra un grupo muy diverso de autoantígenos producto de la ruptura de la tolerancia inmunitaria (Morrow y col., 1999), conllevando al daño de tejidos, múltiples órganos como riñón y corazón; y sistemas (nervioso y hematopoyético), producto de la interacción entre aberraciones del sistema inmunológico, factores hereditarios, hormonales y ambientales (Crispín y col., 2010).

Nuestro grupo de investigación y otros investigadores han descrito numerosas alteraciones en eventos tempranos de la señalización de linfocitos T (LT) de pacientes con LES: diferencias en el patrón de fosforilación en tirosina (Blasini y col., 1998), disminución en el acoplamiento de Sos a Grb2 (Cedeño y col., 2003; Cifarelli, 2003), disminución en la actividad quinasa de ERK1/ERK2 (Cedeño y col., 2003), menor expresión y localización en las balsas lipídicas (BL) y en la sinapsis inmunológica (SI) de LAT (Abdoel y col., 2012), así como defectos en la expresión de la cadena  $\zeta$  en LT estimulados vía TCR/CD3 (Brundula y col., 1999). Estas evidencias sugieren que podrían existir alteraciones en eventos tempranos de señalización en LT de pacientes con LES luego de la activación del complejo TCR/CD3.

Krishnan y col., (2008) proponen un modelo del “recableado” de la señalización del TCR/CD3 donde entra en juego el dueto alternativo FcR $\gamma$ /Syk que sustituye a la dupla CD3 $\zeta$ /ZAP-70, resultando en una señal enzimáticamente 100 veces más potente que la vía canónica del TCR. Adicionalmente, se conoce que existen plataformas de señalización ubicadas en la membrana plasmática, que favorecen y son esenciales para la transducción de señales cascada abajo, conocidas como BL (Jury y col., 2007).

Considerando estas evidencias, nos hemos propuesto evaluar la expresión de las PTKs ZAP-70 y Syk, y su localización en las BL de LT de pacientes con LES y controles sanos luego de la estimulación vía TCR/CD3-CD28. Alteraciones en la expresión y/o localización en las BL de estas moléculas podrían contribuir con el fenotipo hiperactivado observado en LT de estos pacientes, y posiblemente disminuir su umbral de activación conllevando así a funciones alteradas en estas células y a la pérdida de la tolerancia a autoantígenos.

Nuestros resultados muestran que la expresión de ZAP-70 es relativamente similar en pacientes con LES en todos los puntos de estimulación vía TCR/CD3-CD28, al igual que al

comparar con controles sanos (Western blot y microscopía confocal), lo que parece indicar que sus niveles no se ven alterados dada la menor expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR/CD3.

En LT de controles sanos, ZAP-70 parece ubicarse en las BL previo a la estimulación vía TCR/CD3-CD28, mientras que en LT de pacientes con LES, la estimulación logra inducir su translocación a las BL, evento crucial necesario para su activación y función PTK de manera que ocurra la transducción de señales hacia la cascada de las MAPKs. La menor localización de ZAP-70 en las BL, a pesar de sus niveles de expresión normales en LT no estimulados, pudiera ser producto de la menor expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR/CD3 puesto que ZAP-70 es reclutada a las balsas por interacción con esta cadena.

Uno de los hallazgos más interesantes es el incremento en la expresión de Syk en LT de pacientes con LES al estimular vía TCR/CD3-CD28, junto con su menor nivel de degradación, posiblemente más tardía, en comparación con controles sanos, pudiera ser producto de un estado de activación alterado dada las múltiples deficiencias en la señalización temprana vía TCR/CD3-CD28, trayendo como consecuencia una menor ubiquitinación de esta molécula, garantizando así la transducción de señales cascada abajo.

El siguiente hallazgo más relevante de nuestra investigación es que la estimulación de LT vía TCR/CD3-CD28 logró inducir la translocación de Syk a la balsa en controles sanos y pacientes con LES, permaneciendo en las BL durante un período más prolongado en los pacientes, posiblemente con la finalidad de garantizar la transducción de señales hacia la cascada de las MAPKs, quienes determinan el destino de la célula; considerando las numerosas alteraciones antes descritas. Adicionalmente, la permanencia de Syk en la balsa de LT estimulados vía TCR/CD3-CD28, de pacientes con LES, se refleja en una mayor colocalización de Syk con ZAP-70, también localizada en las BL para llevar a cabo su función PTK, resaltando el papel crucial de la localización de moléculas clave en las BL para la transducción de señales cascada abajo.

Estas observaciones acentúan la importancia de la localización en las BL de PTKs, especialmente Syk, como elemento central en eventos de señalización temprana en LT de pacientes con LES subsiguiente a la estimulación vía TCR/CD3-CD28. Es posible que cambios en funciones celulares como localización, translocación a las BL, y/o ubiquitinación de esta proteína contribuya como modulador de la respuesta anormal, fenotipo hiperactivado y pérdida de la tolerancia periférica a autoantígenos observada en estos pacientes.

Palabras claves: LES, balsas lipídicas, Syk, ZAP-70.

## AGRADECIMIENTOS

Durante estos años de mi formación universitaria han sido muchas las personas e instituciones que han permitido la culminación de ésta tan anhelada meta. Esta meta que hoy me hace estar tan plenamente feliz y satisfecha con los resultados obtenidos de la misma.

Principalmente quiero agradecerle a Dios, por otórgame la vida, por guiarme en mis pasos (muchas veces acelerados y otros tantos cautelosos) que se han convertido poco a poco en pasos firmes. Por tu llamado constante a visitarte en tu casa, porque solo tú sabes cuánto bien me hace llenarme de tu palabra. Por darme fuerzas en los momentos más difíciles y susurrarme al oído que todo iba a salir mejor de lo que esperaba, a pesar del pesimismo que podía invadirme. Por el aprendizaje, por todas aquellas experiencias buenas y malas que colocaste, colocas y seguirás colocándome en el camino. Por presentarme durante estos 23 años gente tan maravillosa, desde mi querida mi mamá a aquella persona desconocida que me brindó una sonrisa y/o ayuda desinteresada. Por ayudarme a realizar uno de mis sueños más anhelados...

Quiero agradecer a mi 4x4 (sí, este es el término que te atribuyo querida), mi madre, la del abrazo más sincero, la del regaño que más afecta, la caricia que más alivia, la más consentidora, la del muro robusto (por cierto inderrumbable), la de las comidas saludables, la que siempre ve el lado positivo, la de la opinión más terca, la de las mayores capacidades artísticas (que ni ella misma se imagina) y la del yo sí puedo. Te agradezco a ti, mi talón de Aquiles, mi padre, mi amiga, mi compañera y mi hemisferio izquierdo. Tú más que nadie sabes lo difícil que fue este proceso, y cuánto necesitaba tu comprensión, que no dejé de tenerla en ningún momento. Gracias por escucharme en mis momentos de querer abandonar todo y darme aliento para seguir. Eres la columna que me fortaleció y me brindó el apoyo para poder continuar. Sabes lo orgullosa que me siento de tí y lo que espero que te sientas de mí... porque este es NUESTRO logro. Gracias por tu amor mami.

Igualmente quiero agradecerle de forma significativa y sincera a mi tutora Nursamaa Abdoel, por ser mí guía, mi amiga y compañera. De corazón, gracias por tu entera dedicación, paciencia, ayuda y por siempre estar dispuesta a enseñar. Por abrirme las puertas al mundo de la investigación en el Centro Nacional de Enfermedades Reumáticas (CNER), por mostrarme tu amor a la inmunología y por contagiarme de ese sentimiento. Por tu formación en este mundo

tan complejo de las enfermedades autoinmunitarias, especialmente, el lupus. Gracias por tu apoyo incondicional del cual siempre estaré agradecida.

Asimismo quiero agradecer a la Dra. Ana María Blasini igualmente por abrirme las puertas al mundo de la investigación, por tu enseñanza, apoyo, sugerencias, por estar dispuesta escuchar mis múltiples inquietudes y por siempre tener esas palabras de aliento, así como, por estimular mi asistencia a los congresos, de los cuales con tu compañía espero seguir asistiendo. Infinitas gracias.

Quiero agradecer además al personal del laboratorio de la Sección de Investigación del CNER, a Mayra Mayora por sus charlas que me hacían reír, por sus palabras incentivadoras en mis momentos más difíciles, así como sus regaños; a Teresa Barake igualmente por sus charlas y su apoyo, por su preocupación y por mantener el material siempre listo para poder utilizarlo; a Milagros Rangel por sus palabras motivadoras, por acompañarme en mi búsqueda de muestras de sangre de controles y pacientes con lupus, sobre todo por su experiencia y excelente trato con ellos a la hora de tomar la muestra; a José Daniel Garbán por hacerme reír con sus ocurrencias y por junto con Mayra Chávez mantener siempre limpia mi área de trabajo; y, a Cruz Milano y a Evelyn Alonso por su plena colaboración.

Además, quiero agradecer a los doctores de la consulta externa del Servicio de Reumatología, en especial al Dr. Martín Rodríguez, por su experiencia, excelencia, enseñanza y formación, por sus impecables palabras, sugerencias y comentarios, por creer en mi trabajo y en el arduo trabajo que se ha realizado durante años en el laboratorio, por facilitar a los pacientes y por llenar cuidadosamente las historias clínicas de estos; al Dr. Omar Landaeta por apoyarme con los pacientes, por sus palabras de aliento, por siempre estar dispuesto a brindarme una mano amiga y a resolver incondicionalmente cualquier inconveniente; al Dr. Luis Miguel Valderrama por su constante ayuda, apoyo y siempre dispuesto a tener una sonrisa; a la Dra. Lisa Alfonso por su cariño y preocupación, siempre dispuesta a ayudar; y a todos los doctores que igualmente colaboraron encarecidamente en la búsqueda de pacientes, entre ellos, el Dr. Wilfredo Rodríguez, la Dra. Eileen Macías, Dr. Eliangel García, Dra. Natalia Valera, Dra. María Virginia García, Dra. Yohana Canelon, Dr. Luis Gutiérrez, Dr. Alberto Millán, Dr. Javier García y el Dr. Carlos Prosperi. Aprovecho para agradecer al personal del laboratorio de Reumatología, a Oswaldo, Esther, Elena y Daisy y al personal de la consulta, Mary, Yiriam, Natasha y al grupo de enfermeros por su constante amabilidad y colaboración, así como, al personal del CNER, Luisa, Luz y Eglee.

Quiero agradecer a la Dra. Gloria Vásquez y al proyecto COLCIENCIAS que financió este proyecto de investigación sin cuyo apoyo no hubiese sido posible su ejecución. No sabe lo feliz que me hizo sus palabras Dra Gloria (“esta bacanisimo”) al saber que estaba encantada con los resultados obtenidos. Muchísimas gracias por su apoyo y por creer en nuestro trabajo.

Quiero continuar mis agradecimientos a mi hermoso control sano, mi Jesús Aguiar, por esa palabra de aliento siempre oportuna y acertada, por brindarme siempre tu hombro para llorar sin importar el momento, por estar en medio de mis triunfos, y aún más de mis fracasos. Por tu paciencia y por escucharme siempre. Por creer en mí y hacerme saber de lo que soy capaz. Por tu apoyo 24/7. Por traer a mi vida una nueva pasión: el *running*. Por sobrellevar todo este proceso tan difícil para mí. Gracias por traer el amor a mi vida. ¡Bendita la coincidencia el haberte conocido!. Quiero agradecer a tu hermosa familia, en especial a tu mamá Alicia Aguiar y a tu abuelita Consuelo Escobar, por recibirme en sus vidas de la mejor manera posible, por sus atenciones, por consentirme, por su apoyo incondicional, por quererme como una hija y por sus ricas comidas. Gracias por criar al tierno niño *Yísus*. Además al resto de su familia que siempre estuvieron muy pendiente durante este proceso.

Además un amplio grupo de amigos que me rodean que quiero agradecerles por su hermosa amistad, confianza, por los momentos felices y no tan felices, por brindarme su cariño, por sus palabras de comprensión y sobre todo por su lealtad. Empezaré por mis mejores amigos que a pesar de la distancia siempre he sentido su apoyo y que el sólo pensarlos me pone una sonrisa de oreja a oreja: a Gabriel Casanova, Andreina Teles, Sherezada Moubayyed, Aura Farías y Adriana Ramírez; a mis amigos de la UCV, específicamente la facultad de ciencias: Maybeling Junco, Raiza Barrios, Max Ruelle, Iván Lau, Samuel Ascanio, Michelle García, María Rosa Álvarez, Luis Octavio Romero, Oryza López, Migdalia Ricaurte, Félix Tovar, Ilvany Castillo, María Fernanda Cordobes, Jesús Pino, Nelson Castro, Andrea Pinto, Alejandra Villarroel, Daniel Landi y Yeimy Nieves; entre otras facultades:, Jennifer Moreno, Laura Corredoska, Amanda Urdaneta, Félix Vargas, Jesús Flores, Wolfgang Wilson, Anthony Torrealba, Diana Monasterios, Eunice Jaen, , Mariangélica Casanova, Omar Useche y Marhec Lira. Gracias por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré. Además, a mis Pachacha’s queridas: Ivannova García, Sorangel Carao y Ana Gabriela Sánchez; y a mis otras amigas del colegio: Kemberly Papaddia y Yulezka Tenoira. Mis disculpas si cometo algún olvido injusto. Les estaré siempre profundamente agradecida y los querré eternamente.

Quiero agradecer a la profesora Zelandia Fermín y a Moisés Gamero por ofrecerme sus instalaciones de su laboratorio para mejorar la técnica del Western blot. Muchas gracias por sus sugerencias y por los conocimientos impartidos. Además quiero agradecer a la profesora Maira Oropeza y Sandra Alva por permitirme usar su equipo en el IBE y por sus lindas atenciones.

Además, quiero agradecer a los profesores de la escuela de biología de la Facultad de Ciencias de la UCV, en especial a la profesora Vicenza Cervino, por sus palabras tan lindas y tranquilizadoras, por su sonrisa y por aceptar ser mi cotutora. En general, gracias a todos por su constante formación, por sus enseñanzas siempre tan dedicadas a pesar de las múltiples dificultades por las que atravesamos. Por querer forjar los mejores biólogos del mundo. Admiro su temple y sus ganas de formar una mejor Venezuela.

Quiero agradecerle también a mi familia por estar atentos durante el proceso, por su amor y cariño. A mi bella abuelita Paula que los años la han puesto aun más cariñosa gracias a ti Dios. A mis primas Ninoska, Niurka, Karina y Nidian. A mis tías Francis y Nina. Todas conflictivas pero a la vez siempre dispuestas a escuchar y dar su amor. A mis tios Pedro y Jose. A los bellos hijos de todas mis primas (ya podemos hacer un equipo de futbol sala) Nicol, Veronica, Roberto, Karelys, Niurkelis, Willianny y mi ahijada Nidianny, por su hermosa inocencia, por llenarme de abrazos y considerarme su prima favorita.

Por último, y no menos importante, quiero agradecerles a los controles sanos del banco de Sangre del HUC y a otros amigos que estuvieron dispuestos a participar como donantes. Además a mis pacientes lúpicos que desinteresadamente se ofrecieron a ser parte de este proyecto. Sin ustedes nada de esto hubiese sido posible. Por ustedes seguiremos trabajando.

Las palabras se quedan cortas para expresar todo el agradecimiento que muy bien tienen merecido un sinfín de personas que hicieron esta meta realidad. Mi pago...una gran sonrisa y muchos abrazos para ustedes. ¡Mil gracias!. Esta tesis es también un poquito suya.

*Noymar Luque.*



*Si no puedes volar entonces corre,  
si no puedes correr entonces camina,  
si no puedes caminar entonces arrástrate,  
pero sea lo que hagas,  
sigue moviéndote hacia adelante.*

**Martin Luther King Jr.**

***Dedicado con mucho amor***

***a Dios y a mi mamá...***

## ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Agradecimientos</b> .....	iii
<b>Dedicatoria</b> .....	vii
<b>Índice General</b> .....	viii
<b>Introducción</b> .....	2
Eventos de señalización en linfocitos T.....	8
Balsas lipídicas en eventos de señalización de linfocitos T.....	15
<b>Antecedentes</b> .....	17
Proteínas tirosinas quinasas ZAP-70 y Syk.....	19
Otros hallazgos.....	21
<b>Objetivos</b> .....	25
<b>Pacientes y métodos</b> .....	26
Pacientes y controles.....	26
Aislamiento de linfocitos T de sangre periférica.....	26
Activación de linfocitos T.....	27
Inmunofluorescencia directa e indirecta.....	28
Lisis de linfocitos T.....	29
Inmunoblot.....	29
Microscopía confocal.....	30

Análisis estadístico.....	34
<b>Resultados .....</b>	<b>35</b>
Pureza de linfocitos T obtenidos mediante la técnica de RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail, por citometría de flujo.....	35
Expresión de ZAP-70 en lisados totales de linfocitos T estimulados vía TCR/CD3-CD28, de controles sanos y pacientes con LES mediante la técnica de Western blot.....	38
Expresión de Syk en lisados totales de linfocitos T estimulados vía TCR/CD3-CD28, de controles sanos y pacientes con LES mediante la técnica de Western blot.....	41
Evaluación de la expresión de ZAP-70, Syk y GM1, en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.....	45
Expresión del gangliósido GM1 enriquecido en las balsas lipídicas, en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.....	48
Expresión de ZAP-70 en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.....	53
Localización de ZAP-70 en las balsas lipídicas de linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.....	57

Expresión de Syk en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.....	59
Localización de Syk en las balsas lipídicas de linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.....	63
Colocalización entre Syk y ZAP-70 en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.....	66
<b>Discusión.....</b>	<b>68</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>92</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>94</b>
Apéndice.....	103
Controles sanos y pacientes con LES.....	104
Preparación de soluciones.....	106
Otros reactivos y materiales.....	108
Anticuerpos utilizados y sus diluciones.....	109
Abreviaturas.....	112

## INTRODUCCIÓN

Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y su respuesta coordinada frente a la introducción de componentes microbianos, así como a macromoléculas, como proteínas y polisacáridos y pequeñas sustancias químicas que son reconocidas como extrañas, independientemente de la consecuencia fisiológica o patológica de tal reacción, se define como la respuesta inmunitaria. La defensa contra microbios es mediada por reacciones tempranas de la inmunidad innata y por las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa (Abbas y col., 2012).

La respuesta de la inmunidad innata está basada en mecanismos celulares y bioquímicos, que existen incluso antes de la infección y éstos están listos para responder rápidamente ante exposiciones repetidas. En dicha respuesta inmunológica intervienen macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas las cuales tienen como función la fagocitosis de microbios; mastocitos, eosinófilos y basófilos, encargadas de la protección contra parásitos helmitos y respuestas inmunitarias que causan enfermedades alérgicas; las células NK (del inglés *natural killers*) que tienen acción citotóxica contra células dianas que presentan alteraciones en su superficie tales como células cancerígenas: además los macrófagos y las células dendríticas que tienen como función el procesamiento y la presentación de antígenos (células presentadoras de antígenos) (Abbas y col., 2012; Cooper y col., 2009).

En contraste a la inmunidad innata, existe otra respuesta inmunológica que es estimulada por la exposición a microorganismos infecciosos. Esta respuesta conocida como inmunidad adaptativa (llamada también inmunidad específica o adquirida) incrementa en magnitud, y en su capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a un microbio en particular. La respuesta de la inmunidad adaptativa amplifica los mecanismos de la inmunidad innata y potencia su función. Las características determinantes de la inmunidad

adaptativa son la capacidad de distinguir componentes estructurales de proteínas complejas, polisacáridos y otros antígenos, llamada especificidad; el aumento de la habilidad de responder más vigorosamente a exposiciones repetidas de un mismo antígeno extraño, conocido como memoria; la diversidad del reconocimiento antigénico por medio de un elevado repertorio linfocítico; y una de las propiedades más señaladas del sistema inmunitario, su capacidad para discriminar entre antígenos propios y extraños, lo que constituye un punto crítico para evitar reacciones contra las células y tejidos propios (Abbas y col., 2012).

La respuesta inmunitaria adaptativa inicia con el reconocimiento de los antígenos extraños por linfocitos específicos, que proliferan y se diferencian a células efectoras, y tienen como función la eliminación del antígeno. La fase efectora de la inmunidad adaptativa precisa la participación de varios mecanismos de defensa, incluido el sistema del complemento, los fagocitos, las células NK y las citoquinas (Abbas y col., 2012). En la respuesta inmunitaria adaptativa intervienen tanto los linfocitos T (LT) como los linfocitos B (LB), cada uno con diversas funciones en el sistema inmunitario y diferentes tipos de receptores de antígeno. Los LB, maduran en la médula ósea y son la fuente de anticuerpos circulantes (moléculas de inmunoglobulinas); reconocen y se unen a microbios extracelulares y toxinas, contribuyendo así a su destrucción; además, los LB son capaces de presentar antígenos a los LT (Abbas y col., 2012). Los LT maduran en el timo y reconocen péptidos no solubles asociados a la superficie celular de las células presentadoras de antígenos (CPA). Los LT se subdividen además en poblaciones funcionalmente distintas que se diferencian luego de la selección intratímica en LT cooperadores que expresan la proteína de superficie CD4, y LT citotóxicos que expresan la proteína de superficie CD8 (Murphy y col., 2009). Tras la activación, los LT CD4<sup>+</sup> pueden subdividirse en Th1, Th2, Th17 y LT reguladores (Treg) (Broere y col., 2011).

Para desempeñar sus múltiples funciones, los LT efectores están especializados en reconocer mediante el receptor de LT (TCR) diversos antígenos peptídicos procesados por las CPA y desplegados sobre la superficie de estas últimas (Murphy y col., 2009). Además, los péptidos antigénicos son reconocidos exclusivamente al estar unidos a glucoproteínas de membrana conocidas como moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*), el cual se ubica en la superficie de las CPA y/o en todas las células nucleadas. Hay dos tipos principales de moléculas del MHC, llamados MHC clase I y MHC clase II. Una vez que llegan a la superficie celular con su carga de péptido, las dos clases de moléculas del MHC son reconocidas por diferentes clases funcionales de LT. De esta manera, las moléculas del MHC clase I son reconocidas por LT CD8<sup>+</sup>, y las moléculas del MHC clase II son reconocidas por LT CD4<sup>+</sup> (Murphy y col., 2009). El TCR interactúa de manera directa tanto con el péptido antigénico como con características polimórficas de la molécula del MHC que lo despliega, y esta doble especificidad fundamenta la restricción por MHC de las respuestas de LT (Murphy y col., 2009).

Los LT desempeñan un papel central en las respuestas inmunitarias frente a los antígenos proteicos. Entre sus funciones principales están: 1, la cooperación con los LB en la proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos contra antígenos timodependientes; 2, la inducción de la proliferación de otros LT, a través de la liberación de citoquinas como la interleuquina 2 (IL-2); 3, la activación de células de origen mielomonocítico como macrófagos y células NK a través de la liberación de citoquinas, entre ellas el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y la IL-2; 4, la actividad citotóxica dirigida contra otro tipo de células y/o linfocitos T modificados; 5, la acción sobre células precursoras de la estirpe hematopoyética, mediante la producción de factores de crecimiento de colonias como por ejemplo, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); 6, actividad reguladora sobre LB, monocitos, macrófagos, fibroblastos, entre otros;

contribuyendo de esta manera al mantenimiento de la tolerancia inmunológica (Male y col., 2012).

Los LT juegan un rol principal en montar una respuesta adaptativa efectiva. Evidencias demuestran que señales desde el TCR son cruciales para el desarrollo, homeostasis, activación y tolerancia de LT. El desarrollo de LT en el timo requiere la recombinación apropiada de los segmentos génicos VDJ y la subsiguiente expresión de un TCR funcional (Kragel, 2009; Moroy y Karsunky, 2000). Sin embargo, la intensidad de la señal del TCR en timocitos doble positivos ( $CD4^+CD8^+$ ) dicta el destino de estos LT inmaduros durante la selección tímica (Hayes y Love, 2006). Timocitos doble positivos que reciben señales moderadas por medio del TCR son seleccionados positivamente y experimentan maduración a LT maduros CD4 o CD8 positivos (Takahama y col., 2010), mientras que aquellas que reciben estimulación fuerte mediante el TCR son seleccionados negativamente y mueren por muerte celular programada o apoptosis (Takahama, 2006). La selección negativa elimina LT altamente autorreactivos, mediante diversos mecanismos, estableciendo la tolerancia central de LT. Dichos mecanismos están caracterizados por la expresión intratímica de antígenos específicos de tejidos periféricos, fenómeno conocido como expresión promiscua o ectópica (Sabater, 2007), sujeto a un regulador transcripcional, el gen AIRE (del inglés *autoimmune regulator*) (Derbinski y col., 2001). Se postula que AIRE recluta varios componentes de la maquinaria transcripcional y los dirige, mediante su unión a la matriz nuclear, hacia regiones genómicas específicas donde estarían agrupados los genes regulados por ella (Tao y col., 2006). Sin embargo, muchas clonas autorreactivas sobreviven y viajan a la periferia a los órganos linfoides secundarios, donde son inactivadas, mediante la inducción de anergia o eliminadas mediante apoptosis inducida por activación o pueden sufrir supresión por linfocitos T reguladores que se desarrollaron en los órganos linfoides primarios o secundarios, con la finalidad de evitar respuestas sostenidas contra antígenos



propios. Dichos mecanismos constituyen así la tolerancia periférica de los LT (Fields y col., 1996; Li Wei y col., 1996).

La respuesta contra antígenos propios se denomina autoinmunidad y puede desencadenar enfermedades autoinmunitarias que se caracterizan por lesión de los tejidos y órganos (Abbas y col., 2012). Los mecanismos que normalmente previenen la autoinmunidad pueden considerarse como una sucesión de puntos de verificación. Cada uno de éstos es en parte eficaz para prevenir respuestas contra lo propio y todos ellos en conjunto tienen una acción sinérgica que permite una protección eficiente contra la autoinmunidad sin inhibir la capacidad del sistema inmunológico para instaurar respuestas eficaces contra los microorganismos patógenos (Murphy y col., 2009).

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria que se manifiesta predominantemente en el género femenino, la cual afecta a múltiples órganos incluyendo riñón, sistema nervioso y órganos hematopoyéticos, producto de la interacción entre aberraciones del sistema inmunológico, factores hereditarios, hormonales y ambientales (Crispín y col., 2010). La etiología de esta enfermedad es desconocida, y está caracterizada por la producción de altos niveles de autoanticuerpos contra antígenos resultantes, al menos en parte, de una disregulación de respuestas de LT a autoantígenos (Morrow y col., 1999).

La presencia de al menos cuatro de los siguientes criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR del inglés *American College of Rheumatology*) son requeridos para el diagnóstico del LES (Tan y col., 1998): Rash malar, rash discoide, fotosensibilidad, úlceras orales, artritis (poliartritis no deformante), serositis (pleuritis y/o pericarditis), enfermedad renal (proteinuria), cilindruria, confirmación histológica de nefritis, alteraciones neurológicas (psicosis), trastornos hematológicos (anemia hemolítica/leucopenia o linfopenia/ trombocitopenia), alteraciones inmunológicas, células LE

(célula del lupus), anticuerpos anti-ADN, anticuerpos anti-Sm (anti-Smith), anticuerpos antinucleares (ANA).

Algunas evidencias sugieren que en la iniciación de la enfermedad participan defectos subyacentes en la señalización mediada por receptores de antígenos de LT que conducen a respuestas alteradas por parte de LB, apoptosis incrementada, producción de citoquinas y ruptura de la tolerancia inmunológica (Dayal y Kammer, 1996; Tsokos y Liossis, 1999). Recientes evidencias de diferentes ámbitos han contribuido a la comprensión del LES. En este sentido, tenemos: 1, genes asociados con la expresión de la enfermedad, donde la combinación de alelos de riesgo conllevan a la predisposición. El mecanismo a través del cual estos alelos contribuyen a la autoinmunidad es poco conocido; de hecho, muchos de los polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) (del inglés *single nucleotide polymorphisms*) asociados al LES están dentro de regiones de ADN no codificantes. Entre estos genes tenemos *IRF5*, *osteopontina*, *IRAK1*, *TREX1* y *TLR8*; 2, células inmunitarias anormales o inmunocompetentes que conllevan a la patología inmunológica (Crispín y col., 2010), incluyendo monocitos/macrófagos, células NK, LB y LT (Via y Hendwerger, 1993); 3, el rol de hormonas y cromosomas sexuales en el desarrollo de la enfermedad; así como 4, factores ambientales y epigenéticos importantes que contribuyen a la expresión del LES (Crispín y col, 2010). Además, los individuos afectados por esta enfermedad pueden presentar niveles bajos en proteínas del sistema del complemento (Rynes, 1991; Morgan y Walport 1991) y de la proteína C-reactiva (Robey y col., 1995).

Los LB presentan alteraciones que modifican su comportamiento en la respuesta inmunitaria de pacientes con LES (Crispín y col., 2010). Linfopenia e hiperactividad de LB son algunas de las anomalías más relevantes encontradas en estos pacientes. Los LB en pacientes con LES producen una gran variedad de autoanticuerpos contra componentes solubles y celulares, pero con mayor frecuencia contra antígenos antinucleares (ANAs)

(Crispín y col., 2010) y con mayor especificidad contra ADNdc (ADN doble cadena). Estos autoanticuerpos cambian de isotipo, maduran su afinidad, son de larga sobrevivencia y de producción continua, características que diferencian a los autoanticuerpos de individuos sanos de los de pacientes con LES.

Muchos investigadores han centrado su atención en dilucidar el papel de los LT en la autoinmunidad debido a dos razones importantes: 1) los LT cooperadores son reguladores de todas las respuestas autoinmunitarias (Abbas y col., 2012), por ejemplo, los anticuerpos anti-ADNdc, que se depositan en órganos blanco como el riñón, son de la clase IgG, y requieren para su producción la participación de LT cooperadores (Isenberg y col., 1994; Alexopoulos y col., 1990), de hecho, el tratamiento con inmunosupresores dirigidos contra los LT cooperadores induce mejoría en los pacientes con LES (Via y Hendwenger, 1993); y 2) varias enfermedades autoinmunitarias están ligadas a nivel genético con el MHC (Pérez-Rodríguez, 2005), en este sentido, los LT de pacientes con LES reconocen a través del TCR autoantígenos como partículas de ribonucleoproteínas, aumentando la afinidad de los LB autoreactivos, dando lugar a la producción de autoanticuerpos (Reveille, 2006) .

### **Eventos de señalización en linfocitos T**

La activación de los LT vírgenes es uno de los pasos más importante en el desarrollo de la inmunidad y por tanto requiere, además del complejo TCR/MHC, correceptores y moléculas accesorias en la superficie de los LT con sus correspondientes ligandos en la CPA (Broere y col., 2011). Así, el TCR en realidad reconoce al conjunto formado por el antígeno y los determinantes polimórficos de la molécula del MHC, mientras que las moléculas CD4 y CD8 interactúan con el determinante monomórfico de las moléculas clase II y clase I del MHC, respectivamente, contribuyendo a afianzar la interacción entre el LT y la CPA (Weiss, 1991) e inicia la cascada de señalización intracelular. La señal se convierte en formas bioquímicas diferentes, se distribuye a diferentes sitios de la célula y se mantiene y

amplifica a medida que procede hacia sus destinos (Murphy y col., 2009). El destino final de casi todas las señales es el núcleo y la respuesta celular primaria es la alteración de la expresión génica, esto permite a su vez la síntesis de nuevas proteínas como citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión celular y otras proteínas de la superficie de la célula, y eventos celulares como división, diferenciación y en algunos casos, muerte (Murphy y col., 2009).

Intensas investigaciones a mediados de 1980, usando métodos bioquímicos e inmunológicos dieron a conocer los componentes estructurales del complejo del TCR (Smith-Garvin y col., 2009). El complejo del TCR está compuesto por TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ , y las proteínas CD3 (Hedrick y col., 1984; Malissen y col., 1984). Las proteínas CD3 invariables, consisten de cadenas  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\zeta$ , asociadas con el TCR vía interacciones hidrofóbicas (Borst y col., 1984). Las proteínas CD3 no están directamente involucradas en el reconocimiento de antígenos, pero sus dominios citosólicos contienen los motivos de activación basados en tirosina (ITAMs del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). El ligamiento del TCR dispara la fosforilación de residuos ITAMs, que son responsables de la transmisión de señales (Samelson y col., 1986; Letourneur y Klausner, 1992), y proveen sitios de interacción con PTKs que propagan los eventos de señalización cascada abajo (Broere y col., 2011; Letourneur y Klausner, 1992).

Proteínas tirosina quinasa (PTKs) citosólicas de la familia *Src*, p56<sup>Lck</sup> (Lck) y p59<sup>Fyn</sup> (Fyn), y la proteína quinasa de la familia *Syk* asociada a la cadena  $\zeta$  de 70 kDa (ZAP-70), son activadas por la ligación del TCR (Cantrell, 1996; Chan y col., 1994). La activación de Lck dispara la fosforilación de ITAMs del complejo CD3 (Veillette y col., 1988). La mayor parte de Lck se asocia a la cola citoplasmática de las moléculas correceptoras CD4 y CD8 (Artyomov y col., 2010) mientras que Fyn se encuentra unida constitutivamente a los dominios citoplasmáticos de las cadenas  $\zeta$  del CD3 (Lawrence y col., 1990). Estos sitios así

fosforilados constituyen puntos de anclaje o asociación con otras proteínas como ZAP-70, la tercera PTK más importante en el linfocito T, la cual se enlaza a las cadenas  $\epsilon$  y  $\zeta$  del CD3, al ser activada su región catalítica mediante su autofosforilación en tirosina, (Chan y col., 1995), resultando, de esta manera, en la fosforilación/activación de otras proteínas y el reclutamiento de adaptadores, los cuales orquestan la cascada de señalización río abajo (Figura 1) (Wang y col., 2010).

Para una activación controlada de los LT, es necesario un balance y sincronización de la fosforilación y defosforilación de estas PTKs (Charbonneau y col., 1988). Se conoce que eventos de fosforilación en tirosina que acompañan a la activación de LT son regulados por una serie de proteínas tirosina fosfatasa (PTPs), las cuales se encargan de la defosforilación de las PTKs. La molécula CD45 es la más importante en linfocitos T por su papel en la defosforilación en tirosina del dominio regulatorio de las Src quinasas (Charbonneau y col., 1988; Trowbridge y Thomas, 1994). Otras PTPs como SHP participan en la regulación negativa de la cascada de señalización intracelular.

Cuando los LT en reposo son activadas de manera apropiada por un antígeno, secretan IL-2 y expresan receptores de alta afinidad para IL-2 (IL-2R). La unión de esta citoquina a su receptor promueve una estimulación auto y paracrina, que conlleva a la proliferación de los LT antígeno-específicos. La activación óptima del gen de IL-2 parece depender de la convergencia de al menos tres señales: la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular, la activación de la proteína quinasa C (PKC) y la activación de la molécula p21<sup>Ras</sup> (Ras).

La estimulación de los LT a través del TCR/CD3 involucra al menos dos vías independientes de la PKC. La primera comprende la fosforilación en tirosina de los motivos ITAM de las cadenas del complejo CD3. El aumento de la actividad quinasa de Lck conlleva a la fosforilación de p95<sup>vav</sup> (Vav). La fosforilación de Vav ocasiona un aumento en la actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina de esta molécula o actividad GEF (del

inglés *guanine nucleotide exchange factor*) que culmina con la transición de la forma inactiva Ras-GDP a la forma activa Ras-GTP (Wu y col., 1995).

La segunda vía comprende el reclutamiento de ZAP-70. La fosforilación de ITAMs de la cadena  $\zeta$  recluta a ZAP-70 mediante sus dominios SH2, la cual se une específicamente a residuos fosfotirosina de los ITAMs (Chan y col., 1992; Irving y col., 1993). ZAP-70 fosforila dos proteínas adaptadoras claves: Ligador para la activación de LT (LAT, del inglés *Linker for activation of T cell*), y la fosfoproteína de leucocitos de 76 kDa con dominio SH2 (SLP-76, del inglés *SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa*) (Zhang y col., 1998; Bubeck y col., 1996). LAT fosforilado recluta proteínas que contienen dominios SH2, incluyendo fosfolipasa C  $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1), la subunidad regulatoria p85 de IP $_3$ K, Grb2, y Gads, para formar un ensamblaje subcelular (Zhang y col., 1998; Liu y col., 1999). SLP-76 une el complejo por unión a Gads y PLC $\gamma$ 1, vía regiones ricas en prolina (Pivniouk y col., 1998). Grb2 está constitutivamente unido a Sos (del inglés *son of sevenless*), el cual es un factor intercambiador de nucleótidos para ambas GTPasas Ras y Rho. El complejo Grb-Sos puede formar dos complejos distintos: SLP76-Grb2/GADS-Sos y LAT-Grb2-Sos (Koretzky, 1997; Erick y col., 1998), permitiendo así la activación de Ras (Figura 1).

Una tercera vía de activación de Ras involucra a la PKC y es resultado de la fosforilación de PLC $\gamma$ 1 por ZAP-70 e Itk, una PTK que es fosforilada en tirosina y activada por Lck, la cual induce la fosforilación en tirosina de PLC $\gamma$ 1, su translocación a la membrana y la activación de su unidad catalítica (Weber y col., 1992). PLC $\gamma$ 1 hidroliza fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en dos segundos mensajeros esenciales 1,4,5-inositoltrifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG) (Zhong y col., 2008). Estos segundos mensajeros estimulan el aumento de la concentración de Ca $^{2+}$  intracelular y la activación de la PKC respectivamente, dos señales críticas para el proceso de activación linfocitaria (Weber y col., 1992). IP $_3$  y DAG

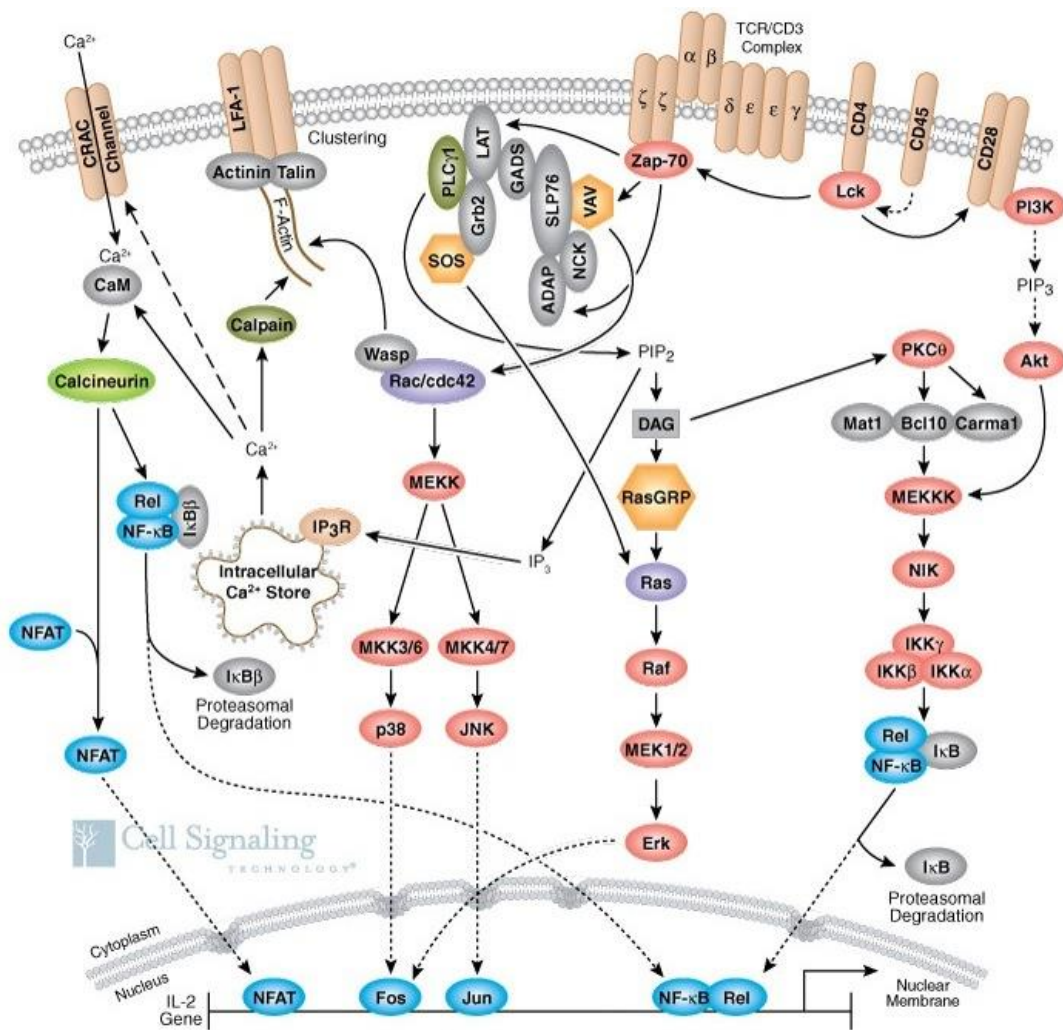
inician una variedad de vías de señalización distales.  $IP_3$  dispara la vía de señalización NF-AT–calcineurina dependiente de  $Ca^{2+}$  (Zhong y col., 2008; Oh-hora y Rao, 2008) (Figura 1).

Una vez activada Ras por cualquiera de las vías, la señalización pareciera seguir un curso lineal que incluye la activación secuencial de MAPKs (del inglés *mitogen-activated protein kinases*). En linfocitos T esta cascada de MAPKs se inicia con la activación de Raf-1. Esta primera MAPK activa a una segunda MAPK conocida como MEK y ésta, a su vez, activa a una tercera MAPK llamada ERK (del inglés *extracellular signal regulated kinase*), que es una enzima responsable de la fosforilación de diversos factores de transcripción, entre los cuales se encuentran AP-1, AP-3, NF- $\kappa$ B y NF-AT (Zhang y Dong, 2005) (Figura 1).

Es importante destacar que para que ocurran estos eventos de señalización intracelular, y así la activación óptima de los LT, además de requerirse el entrecruzamiento del complejo TCR/CD3 es necesario una señal coestimuladora. Una de las moléculas coestimuladoras por excelencia es CD28, cuya unión a su ligando B7/BB1 o B7/BB2 que se expresa en la CPA, coestimula la proliferación de LT, la producción de citoquinas y la generación de LT citotóxicos (Kaneko y col., 1996). Por su parte, CTLA4 (del inglés *cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*) bajo interacción con CD80 y CD86 provee una señal coestimuladora negativa para completar la activación y la función celular de los LT (Wang y Chen, 2004). La naturaleza de esta señal coestimuladora ha sido explicada en términos de la reorganización de las balsas lipídicas (ver más adelante). En este sentido, el entrecruzamiento del TCR empleando cantidades subóptimas de anticuerpo anti-CD3 no implica el agrupamiento de las balsas, mientras que la coactivación de CD28 promueve la reorganización del citoesqueleto de actina, conllevando al reclutamiento de las balsas lipídicas al sitio de contacto, y a la señalización sostenida requerida para la activación de los LT (Viola y col., 1999; Valitutti y col., 1995).

Como se mencionó anteriormente, la integración del aporte de dos señales, una de fuerza variable mediada por la unión del antígeno con el MHC, dependiente de la cantidad y afinidad del antígeno por el TCR, y la otra coestimuladora llevada a cabo por CD28, determina el destino de los LT hacia activación o anergia (Sharpe y Abbas, 2006). Se sabe que el contacto entre la molécula CD28 de la célula T y la molécula B7 de la CPA facilita este acoplamiento y además recluta a una serie de efectores especiales para disparar una señal dependiente del TCR (Miche y col., 2001). Además, es importante destacar que el contacto entre estas moléculas, induce fosforilación en tirosina de la cola citoplasmática de CD28 mediada por las PTKs de la familia src, así como su acoplamiento a la subunidad regulatoria de la fosfoinositol 3-quinasa (IP3K) recluta a la subunidad catalítica clase I de IP3K a la membrana que genera PIP3 y ancla proteínas que contienen un dominio con homología a pleckstrina a la membrana plasmática incluyendo la subunidad catalítica clase III de IP3K, IP3KC. IP3K participa en la conversión de PIP2 a PIP3. PIP3 es necesaria para la activación de Akt, la cual a su vez regula diversas moléculas cascada abajo. Akt está involucrada en diversas funciones tales como translocación de proteínas, metabolismo celular e inhibición de apoptosis, etc (Okkenhaug y Vanhaesebroeck, 2003). Las src quinastas, a su vez, fosforilan en tirosina a ciertas moléculas de señalización como PLC $\gamma$ 1, la cual amplifica el incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular y el acoplamiento de Vav-1, SLP-76, entre otras moléculas, a proteínas adaptadoras. PLC $\gamma$ 1 utiliza PIP2 como sustrato generando IP3 y DAG. IP3 ocasiona la liberación de iones Ca<sup>2+</sup> vía el receptor IP3 que conlleva a la activación de NFAT y su translocación al núcleo; simultáneamente, DAG activa la PKC $\theta$ , y ésta a su vez junto con calmodulina y CalmK2 regula la fosforilación del complejo IKK, y finalmente la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. NFAT y NF- $\kappa$ B poseen un papel crucial en la regulación de la transcripción del gen que codifica para IL-2 y en factores anti-apoptóticos (Figura 1) (Sanchez-Lockhart y col., 2004; Nishiyama y col., 2005).





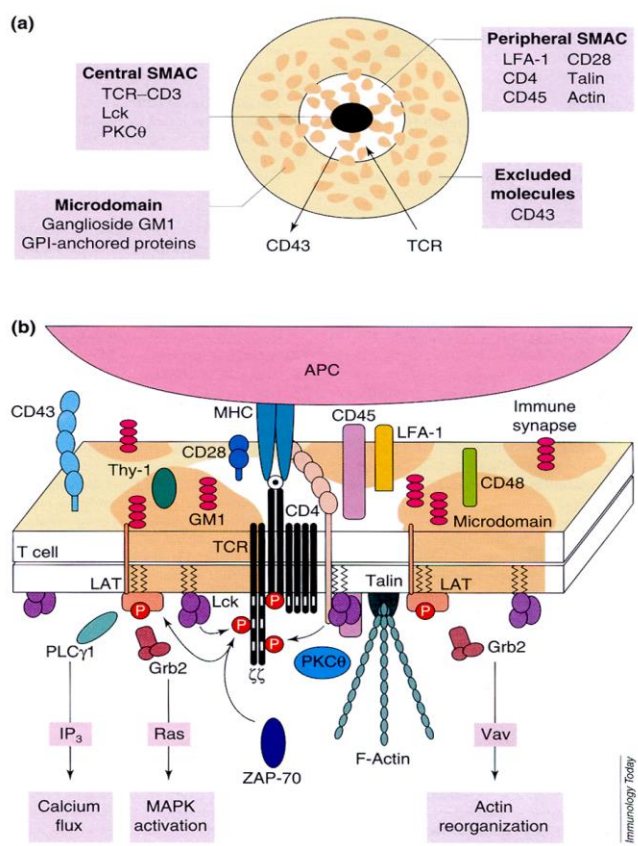
**Figura 1.** Cascada de señalización de LT luego del ligado del complejo TCR/CD3. Tomado de <http://trenchesofdiscovery.blogspot.com/2012/03/immunology-under-microscope-knowing.html>

## **Balsas lipídicas en eventos de señalización de linfocitos T**

Las balsas lipídicas son microdominios de membrana conformadas por interacciones débiles entre lípidos y proteínas de membrana y se caracterizan por ser fracciones lipídicas insolubles en detergentes no iónicos a 4 °C. Se les conoce además como microdominios GPI por estar enriquecidas en esfingolípidos, colesterol y proteínas ancladas por grupos glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Montixi y col., 1998). Es bien conocido que el TCR activa el montaje de un gran complejo macromolecular y que las balsas lipídicas constituyen plataformas para este complejo de señalización (Montixi y col., 1998; Xavier y col., 1998; Zhang y col., 1998). En LT, el entrecruzamiento del TCR induce una rápida agrupación de las balsas lipídicas que promueve la activación inmediata de las *Src* quinasas y la acumulación subsiguiente de una serie de sustratos fosforilados (Kane y col., 2000; Langlet y col., 2000; Leo y Schraven, 2001) incluyendo prácticamente todas las moléculas CD3 $\zeta$  hiperfosforiladas (Montixi y col., 1998; Xavier y col., 1998; Kosugi y col., 1999), las formas activadas de la tirosina quinasa ZAP-70 y PLC $\gamma$ 1, IP3K, el factor intercambiador Vav/Rac/CDC42, y LAT (Brdicka y col., 1998; Zhang y col., 1998) en el área de contacto entre la CPA y el LT conocida como sinapsis inmunológica (SI) (Monks y col., 1998; Dustin y col., 2000; Davis, 2002) (Figura 2). Consistente con estos hallazgos, la depleción de colesterol empleando metil- $\beta$ -ciclodextrina disocia estas proteínas que se ubican en las balsas lipídicas e inactiva la cascada de señalización (Moran y col., 1998; Xavier y col., 1998).

Aunque los primeros eventos de fosforilación ocurren a los pocos segundos del entrecruzamiento del TCR, se requiere el contacto sostenido y la interacción de los LT con la CPA para la activación completa de los LT. Estudios de la SI han reportado una estructura en forma de anillo formada por el complejo TCR/MHC-antígeno alrededor de un conjunto de moléculas de adhesión, donde luego de la activación del complejo del TCR ocurre la

inversión de esta estructura, es decir, la relocalización del complejo TCR/MHC-antígeno al centro, y la formación de regiones segregadas espacialmente conocidas como complejos de activación supramolecular (SMAC del inglés *supramolecular activation complexes*). La SI madura contiene un SMAC central (c-SMAC), conformado por el complejo TCR/MHC-antígeno y una amplia variedad de moléculas de superficie, correceptores y moléculas accesorias, rodeado por un SMAC periférico (p-SMAC), el cual está compuesto principalmente por moléculas de adhesión y moléculas cuyas colas extracelulares son muy largas como CD45. Así, la SI formada en la superficie de la célula puede proporcionar interacciones celulares prolongadas y una señal sostenida que conduce al flujo de  $Ca^{2+}$ , reorganización del citoesqueleto, y así, la activación de los LT (Broere y col., 2011) (Figura 2).



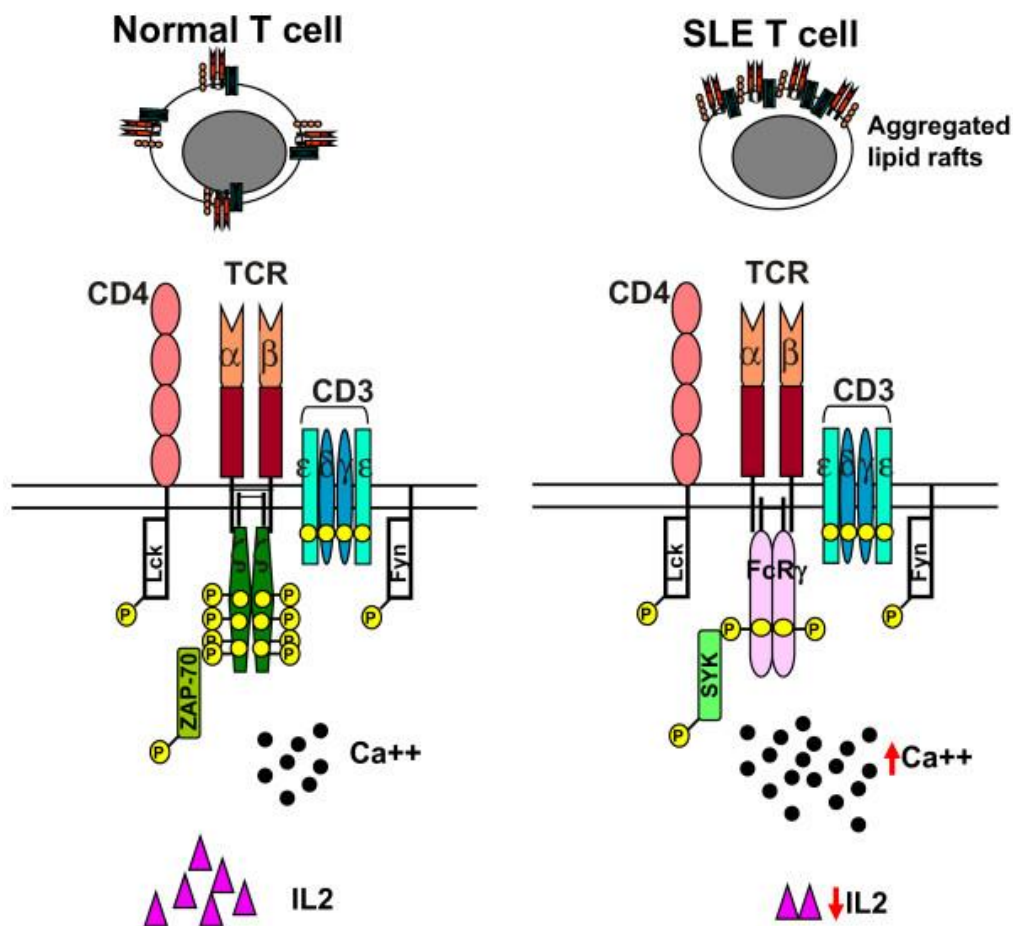
**Figura 2.** Formación del SMAC y rearrreglo de los microdominios de membrana de linfocitos T. Tomado de Llangumaran y col. 2000. *Immunol Today*. **21:** 2-7.

## ANTECEDENTES

Los LT de pacientes con LES muestran una serie de anomalías funcionales. Por ejemplo, LT de sangre periférica muestran una disminución de la producción de IL-2 (Alcocer-Varela y Alarcon-Segovia, 1982; Linker-Israeli y col., 1983; Solomon y col., 2001), disminución de la respuesta a esta citoquina (Alcocer-Varela y Alarcon-Segovia, 1982), una tasa de proliferación alterada (Stekman y col., 1991) y apoptosis incrementada (Kovacs y col., 1996; Lorenz y col., 1997), en respuesta a la estimulación a través del complejo TCR/CD3. Debido a que los LT juegan un papel central en el mantenimiento de la anergia periférica a antígenos propios, es coherente que algunas de las anomalías funcionales observadas en esta subpoblación de linfocitos T pueden contribuir a la ruptura de la tolerancia en pacientes con lupus (Blasini y Rodríguez, 2004).

Como se mencionó anteriormente, el entrecruzamiento del TCR/CD3 origina la fosforilación en tirosina de los ITAMs de la cadena  $\zeta$  del TCR por parte de Lck y Fyn, que conlleva al reclutamiento de ZAP-70 a través de sus dominios SH2. Muchos estudios demuestran que esta señalización del TCR se encuentra alterada en pacientes con LES (Liossis y col., 1998; Tsokos, 2011): en nuestro laboratorio se reportó una disminución de la expresión de la cadena  $\zeta$  del TCR (Brundula y col., 1999); Krishnan y col., reportaron que ocurre un “recableado” de la señalización vía TCR/CD3 donde la cadena  $\zeta$  del complejo CD3 es sustituida por el receptor Fc  $\gamma$  (FcR $\gamma$ ), y por ende ZAP-70 es a su vez sustituida por la PTK de la familia Syk citoplasmática del bazo de 72 kDa (Syk) (Krishnan y col., 2008; Kyttaris, 2010) (Figura 3). FcR $\gamma$  es homólogo en forma y función a la cadena  $\zeta$  del CD3, aunque esta última tiene tres dominios ITAMs mientras que FcR $\gamma$  sólo tiene uno (Crispiny col., 2008; Grammatikos y Tsokos, 2012). La señalización a través de este “recableado del TCR” se presume que es más fuerte debido a este dueto alternativo FcR $\gamma$ /Syk, que es enzimáticamente 100 veces más potente que la vía canónica CD3 $\zeta$ /ZAP-70 (Oliver y col.,

1944; Krishnan y col., 2003). Una consecuencia directa de este reensamblaje del TCR, podría ser la regulación defectuosa de quinasas clave que intervienen en las primeras etapas de activación del TCR (Blasini y Rodriguez, 2004). Krishnan y col. encontraron que la transfección de la cadena FcR $\gamma$  dentro de los LT amplifica eventos de señalización del TCR en una manera Syk quinasa dependiente y puede así imitar la señalización anormal de LT de pacientes con LES (Krishnan S. y col., 2004) (Figura 3).

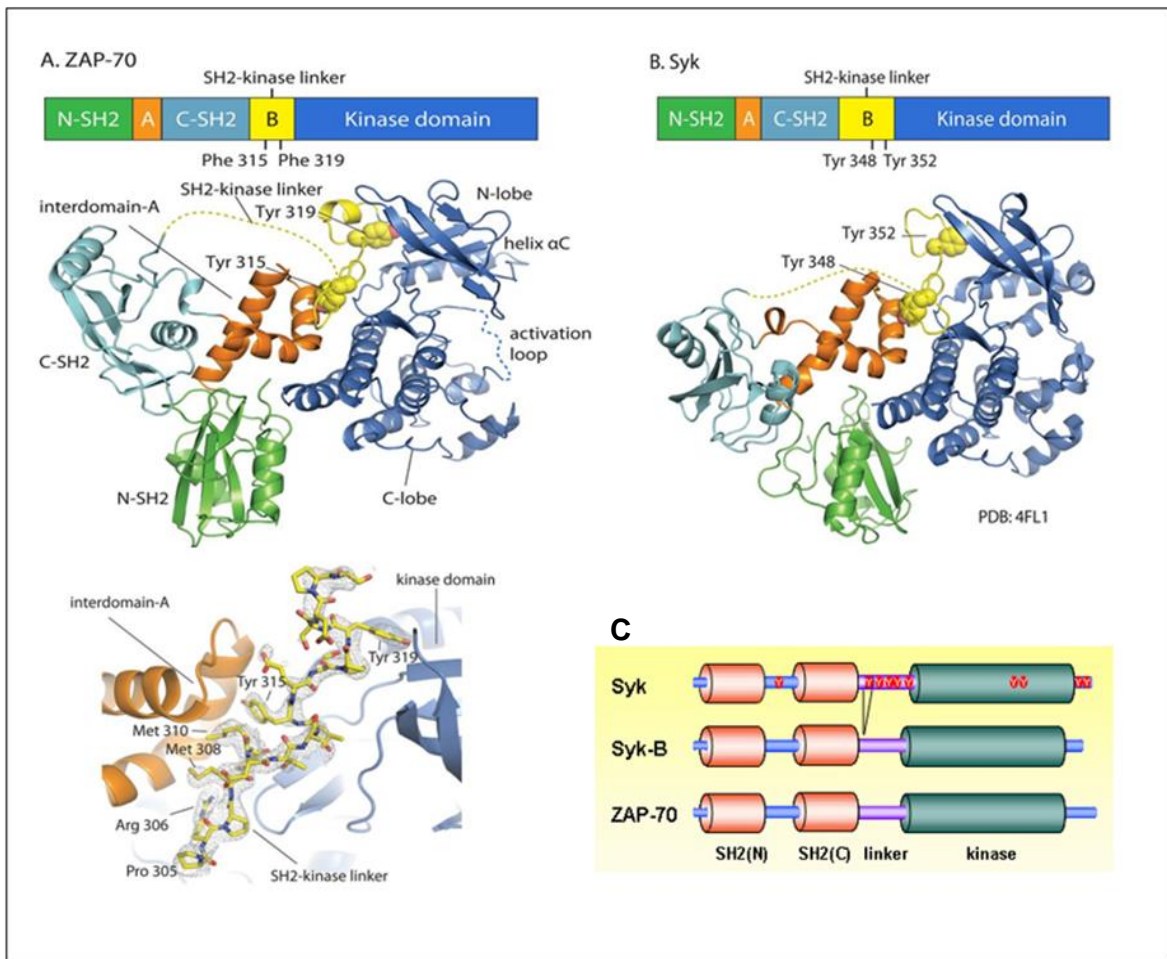


**Figura 3.** Recableado de la arquitectura de la señalización del TCR en LT de pacientes con LES. Tomado de Moulton y Tsokos, 2011. *Arthritis Research & Therapy*. **13**: 207.

## Proteínas tirosinas quinasas ZAP-70 y Syk

ZAP-70 se expresa en LT y en células NK, mientras que Syk se expresa en muchos tipos de células hematopoyéticas, incluyendo LB, mastocitos, plaquetas; en subconjuntos de LT tales como timocitos, LT  $\alpha\beta$  vírgenes, y LT  $\gamma\delta$  intraepiteliales (Chan y col., 1994; Mallick-Wood y col., 1996; Orchansky y col., 1996). Syk desempeña un papel importante en la transducción de señales iniciada por los inmunorreceptores clásicos, incluyendo el BCR, FcR, y los receptores de células NK (Tohyama, 2009; Berton y col., 2005; Crowley y col., 1997). Debido a que el desarrollo de LT y LB requiere una transducción intacta de la señal mediada por el receptor de antígeno (TCR y BCR, respectivamente), la deficiencia de Syk conduce a la ausencia completa de LB maduros, y la deficiencia de ZAP-70 resulta en una reducción marcada de respuestas mediadas por el TCR (Turner y col., 1995; Elder y col., 1994; Qian y col., 1996). Aunque se pensaba que la señalización del BCR era mediada por Syk y la señalización del TCR vía ZAP-70, datos recientes muestran que ZAP-70 cumple un papel en el desarrollo de LB y Syk es importante en la pre-señalización de LT. Pareciera que Syk y ZAP-70 han superpuesto funciones en el desarrollo temprano de los linfocitos T (Schweighoffer y col., 2003; Palacios y Weiss, 2007).

La estructura de ZAP-70 y Syk está altamente conservada; esto incluye desde el amino terminal al extremo carboxilo: 1, dos dominios SH2, los cuales se unen a dominios ITAMs fosforilados; 2, una región adaptadora de 80 a 110 aminoácidos, donde se ha postulado que permite unir y reclutar efectores celulares; 3, un dominio catalítico, incluyendo sitios de unión de ATP y fosforilación de tirosina; y 4, una extensión carboxilo terminal que posee una función aún no determinada (Latour y col., 1997) (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura tridimensional de las proteínas tirosinas quinasas ZAP-70 (A) y Syk (B) y estructura esquemática del tándem de los dominios SH2 y los dominios quinasas que son mostrados como cilindros naranja y verde, respectivamente. Los tubos morados representan la región enlazadora conectando los dominios SH2 y el dominio quinasas (C). Tomado de Yan y col., 2013. *Mol Cell Biol.* **33**: 2188-2120.

Han sido reportadas diferencias en las asociaciones moleculares y actividades de Syk y ZAP-70 y se han atribuido a la estructura de estas dos quinasas. La asociación de ZAP-70 en vez de Syk, con proteínas Src quinasas que conllevan a una iniciación de la activación de la cascada enzimática es un ejemplo de ello (Van Leeuwen y Samelson, 1999; Chu y col., 1998). Del mismo modo, la expresión diferencial de ZAP-70 y Syk en subclases de LT podrían explicar las diferencias funcionales resultantes de la señalización del TCR. Los LT CD4<sup>+</sup> efectoras activadas *in vitro*, expresan altas cantidades de Syk, y muestran mayor asociación con el TCR en comparación con ZAP-70 (Krishnan y col., 2003).

En cuanto a pacientes con LES, la cinética de las dos vías de señalización inducidas por el TCR involucrando Syk, a saber polimerización de actina y flujo de Ca<sup>2+</sup>, se encuentran incrementadas (Krishnan y col., 2004). Además, Krishnan y col. observaron que Syk estaba expresado en altas cantidades en LT de pacientes lúpicos comparado con controles sanos, y que los LT de pacientes con LES exhiben uniones distintas de Syk y ZAP-70 a moléculas de señalización involucradas en la polimerización de actina y señalización de Ca<sup>2+</sup> tales como Vav, PLCγ1 y LAT (Krishnan y col., 2004). Por otra parte, Grammatikos y col., utilizando un arreglo de expresión de genes, demostraron que la expresión forzada de Syk en LT normales induce una expresión aberrante de diversas moléculas, como IL-21, el receptor de superficie CD44, y moléculas intracelulares PP2A y OAS2 y disminuyen después del silenciamiento de Syk. El silenciamiento de Syk en LT de pacientes con LES normaliza la expresión de muchas moléculas expresadas anormalmente (Grammatikos y col., 2013). Con base en estos resultados, está postulado que Syk y ZAP-70 podrían tener distintos roles durante la activación de LT de pacientes con LES.

### **Otros hallazgos**

Una consecuencia directa del reensamblaje del TCR, podría ser la regulación defectuosa de quinasas clave que intervienen en las primeras etapas de activación del TCR



(Blasini y Rodriguez, 2004). Nuestro equipo de investigación y otros han demostrado un patrón anormal de fosforilación en tirosina en LT de sangre periférica de pacientes con lupus (Liossis y col., 1998; Blasini y col., 1998; Matache y col., 1996), además de un aumento en la actividad quinasa de Fyn que no fue observado para otras PTKs como Lck y ZAP-70, además de una menor cantidad de Fyn y Lck. Igualmente, no se observaron diferencias al estudiar la actividad fosfatasa de CD45 en linfocitos T no estimulados y estimulados vía TCR/CD3 (Blasini y col., 1998).

Por otra parte, la estimulación de LT de pacientes con LES por la vía TCR/CD3 no es suficiente para inducir la activación de las MAPKs ERK1 y ERK2. Nuestro equipo reportó que la coestimulación de linfocitos T de pacientes con LES por la vía TCR/CD3 y la PKC, induce una menor fosforilación y actividad catalítica de las MAPKs. Por otra parte, la estimulación de la PKC por sí sola, utilizando el acetato de forbol miristato (PMA) induce niveles de doble fosforilación y subsecuente activación similares en las MAPK de controles y pacientes. Adicionalmente se observó que los niveles de las MAPK son similares en controles sanos y pacientes con LES (Cedeño, 2000; Cedeño y col., 2003). Esto sugiere que la capacidad intrínseca de las MAPK de ser doblemente fosforiladas como también su actividad quinasa no se encuentra alterada en los linfocitos T de los pacientes y que algunas alteraciones ya descritas y/o aún desconocidas, en eventos tempranos de la señalización vía TCR/CD3, podrían estar generando una activación defectuosa de ERK1 y ERK2. Trabajos realizados posteriormente demostraron que en linfocitos T no estimulados de pacientes con LES ocurre un acoplamiento anormal a Grb2 de proteínas fosforiladas en tirosina, como c-Cbl encargado de ubiquitinar diversas proteínas para su degradación proteasomal, y una disminución en la unión de Sos a Grb2 en LT sin estimular y estimulados de pacientes con LES al comparar con controles sanos y controles inflamatorios de la enfermedad (Cedeño y col., 2003; Cifarrelli, 2003). El acoplamiento de Sos a Grb2 es importante para la formación del complejo ZAP-70/Grb2/Sos que es reclutado hacia la membrana por interacción con LAT

una vez que ésta es fosforilada en tirosina por ZAP-70. Sos es indispensable para la activación de Ras y el disparo de la cascada Ras/Raf/ERK.

Los LT de pacientes con lupus exhiben balsas lipídicas agrupadas, indicando que los LT se encuentran “preparados” para su activación (figura 4). La organización de moléculas de señalización dentro de las balsas lipídicas, es vital para la regulación de vías de activación de linfocitos T (Brundula, V. y col., 1999; Pang, M. y col., 2002; Jury, E. y col., 2003). Los dominios de las balsas proveen un ambiente que favorece la transducción de señales del inmunoreceptor, y su interrupción incluye el desplazamiento anormal de moléculas de señalización. Se ha demostrado que las balsas lipídicas poseen una composición alterada de dichas moléculas que interrumpen vías de señalización intracelulares y afectan la función de la célula T de pacientes con LES (Kabouridis y col., 1997; Zhang, y col., 1998; Xavier, y col., 1998; Montixi y col., 1998; Kabouridis, y col., 2005). Estas alteraciones incluyen, el incremento de la expresión de FcR $\gamma$ , Syk, PLC $\gamma$ , con una disminución en la expresión de Lck (Jury y col., 2003; Jury y col., 2004; Krishnan y col., 2004; Kabouridis y Jury, 2008).

Además, es importante destacar que los LT de pacientes con LES poseen un pool más extenso y son más robustas en su capacidad para generar balsas lipídicas. Estas balsas lipídicas de pacientes con LES difieren en su composición y presentan una dinámica acelerada del citoesqueleto, así como, una respuesta aumentada de Ca<sup>2+</sup>, al menos en parte, a través de mecanismos dependientes de balsas lipídicas, en comparación con controles sanos (Krishan y col., 2004).

La integridad de la cascada de Ras/Raf/MAPK es crítica para el mantenimiento de la tolerancia en LT, un proceso que falla en pacientes con LES (Cedeño y col., 2003). Como se mencionó anteriormente, en nuestro equipo se han descrito ciertas anormalidades en la actividad catalítica de ERK-1 y ERK-2 en LT de pacientes con lupus, en respuesta a la

estimulación vía el complejo TCR/CD3. Se demostró que la molécula Grb2 en efecto, exhibe una disminución en el acoplamiento de Sos a Grb2 en pacientes con LES (Cedeño y col., 2003). Por otra parte, se observó una disminución en la expresión y una localización anormal de LAT dentro de las balsas lipídicas y en la sinapsis inmunológica de LT activados de pacientes con lupus luego de la estimulación vía TCR/CD3 (Abdoel y col., 2012).

En este sentido, dado los defectos mencionados en la expresión de la cadena  $\zeta$  en linfocitos T de pacientes con LES (Brundula y col., 1999), y en consecuencia, el modelo del “recableado” de la señalización del TCR/CD3 propuesto por Krishnan y col., donde entra en juego el dueto alternativo FcR $\gamma$ /Syk que es enzimáticamente 100 veces más potente que la vía canónica CD3 $\zeta$ /ZAP-70, nos hemos propuesto evaluar la expresión de las PTKs ZAP-70 y Syk, así como su translocación y/o localización en las balsas lipídicas de LT de pacientes con LES y controles sanos luego de la estimulación vía TCR/CD3-CD28. Alteraciones en la expresión y/o localización en la balsa de ZAP-70 y Syk podrían contribuir con el fenotipo hiperactivado observado en LT de estos pacientes, y posiblemente disminuir su umbral de activación conllevando así a funciones alteradas en estas células y a la pérdida de la tolerancia a autoantígenos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar la expresión y localización de las proteínas tirosinas quinasas (PTKs) ZAP-70 y Syk en balsas lipídicas de linfocitos T estimulados vía TCR/CD3 y CD28, de pacientes con LES.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la expresión de ZAP-70 en linfocitos T estimulados vía TCR/CD3 y CD28, de pacientes con LES y controles sanos mediante Western blot y microscopía confocal.
2. Determinar la localización de ZAP-70 en las balsas lipídicas de linfocitos T estimulados vía TCR/CD3 y CD28, de pacientes con LES y controles sanos por microscopía confocal.
3. Evaluar la expresión de Syk en linfocitos T estimulados vía TCR/CD3 y CD28, de pacientes con LES y controles sanos mediante Western blot y microscopía confocal.
4. Determinar la localización de Syk en las balsas lipídicas de linfocitos T estimulados vía TCR/CD3 y CD28, de pacientes con LES y controles sanos por microscopía confocal.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

### **Pacientes con LES y controles sanos**

Los pacientes con LES fueron diagnosticados según los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Tan y col., 1998). Estudiamos 21 pacientes con LES con una edad promedio de 40 años (entre 22-63 años), de los cuales todos fueron de sexo femenino. El promedio de duración de esta enfermedad en estos pacientes fue de 9 años (entre 0,5-20 años). El promedio del índice de actividad clínica del LES (SLEDAI) era de 2 (0-6). Al momento del estudio 19 de los pacientes eran tratados con prednisona 9,16 mg/día (5-25 mg/ día) o una combinación de glucocorticoides más ciclofosfamida intravenosa (n=2) con una dosis de 1 mg/día azatioprina (n=4) con una dosis promedio de 112,5 mg cada 15 días (entre 50 – 150 mg), drogas anti-maláricas (n=11) (hidroxicloroquina y cloroquina) con una dosis promedio de 270 mg/día (entre 150 – 500 mg/día). Además estudiamos 26 controles sanos los cuales eran donantes voluntarios del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Caracas o personal del laboratorio, con una edad promedio de 34 años (entre 21–59 años), donde 23 fueron de sexo femenino. La tabla 1 del apéndice se encuentra un resumen de los datos recolectados de los controles y pacientes estudiados.

### **Aislamiento de linfocitos T de sangre periférica**

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aislaron a partir de 60 mL de sangre venosa heparinizada mediante centrifugación en gradientes de Ficoll durante 30 minutos a temperatura ambiente a 400 x g. Para ello, se tomaron 30 mL de sangre y se completaron hasta 40 mL con solución salina y se colocaron lentamente sobre 10 mL de Ficoll sin perturbar el gradiente. Luego de la centrifugación, se aisló el anillo de células mononucleares y éstas se lavaron tres veces con solución salina mediante centrifugaciones sucesivas de 10 minutos cada una. Los dos primeros lavados se realizaron a 400 x g y el tercero a 250 x g. Se realizó el conteo de la población celular en una cámara de Neubauer.

Paralelamente, los eritrocitos y demás células polimorfonucleares que quedaron en el fondo del Ficoll se lavaron con 20 mL de solución salina centrifugándose a 400 x g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se diluyeron 1:4000 en medio RPMI para contar en una cámara de Neubauer.

Respetando una proporción celular de 1:50, las CMSP se resuspendieron en un volumen adecuado de una suspensión de eritrocitos. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con una cantidad determinada de RossetteSep™ *Human T Cell Enrichment Cocktail* que contiene anticuerpos anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, y anti-CD66b, a una concentración de 50 µL/mL de la mezcla celular. Este cocktail contiene anticuerpos que forman complejos tetraméricos con diversas células tales como eritrocitos, LB, macrófagos y células dendríticas, permitiendo así, aislar por selección negativa los LT. Al cabo de este tiempo, se agregó el mismo volumen de una solución de buffer fosfato salino (BFS) 1X con 2% de suero fetal bovino (SFB). Posteriormente se realizó un gradiente de densidad con Ficoll mediante centrifugación a 400 x g durante 20 minutos. Se recolectó el anillo celular correspondiente a LT. El anillo celular se lavó 3 veces con 10 mL de BFS 1X con 2% de SFB, cada uno a 400 x g durante 10 minutos. El botón celular enriquecido en LT se resuspendió en 5 mL de Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) suplementado con 10% de SFB, 1% de L-glutamina y 2% de estreptomicina/penicilina. Se procedió a contar el número de LT y se determinó la viabilidad celular por exclusión del azul de tripano en una cámara de Neubauer.

### **Activación de linfocitos T**

Para entrecruzar los receptores TCR/CD3 de las LT durante su estimulación in vitro con el anticuerpo monoclonal (AcM) anti-CD3ξ (OKT3) utilizando el anticuerpo policlonal (AcP) GAM (del inglés *Goat Anti Mouse*), se incubaron placas multipozo (placas de 6 pozos para lisados de balsas lipídicas y 12 pozos para lisados celulares) de poliestireno durante

toda la noche a 4 °C con GAM a una concentración de 10 µg/mL diluido en buffer bicarbonato pH 9,6 (0,25-1 mL/pozo). Al momento de su uso, la placa se lavó dos veces con solución salina isotónica para eliminar el anticuerpo no adherido al plástico.

2,5–10x10<sup>6</sup> LT se activaron durante diferentes tiempos con OKT3 a una concentración de 50 µg/mL y co-estimulados con el AcM anti-CD28 *clon* 28.1 a una concentración de 10 µg/mL, en un volumen final de 0,5-1 mL de medio RPMI en placas de cultivo tratadas con GAM. Las placas se colocaron en una incubadora a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda. Al cabo de los diferentes tiempos de estimulación, se retiraron las células de la placa y se detuvo la activación añadiendo 0,5 mL de medio RPMI frío.

### **Inmunofluorescencia directa e indirecta por citometría de flujo**

Para evaluar la pureza de nuestra población celular correspondiente a linfocitos T, se analizó la expresión de diversas moléculas en la superficie celular, para ello se incubaron 0,5-1x10<sup>6</sup> CMSP o LT, con una dilución óptima del AcM no conjugado o conjugado a FITC (del inglés *fluorescein isothiocyanate*) durante 30 minutos a 4 °C. Se realizaron 3 lavados por centrifugaciones sucesivas a 400 x g con 1 mL de BFS 1X en presencia de 1% ASB (albúmina sérica bovina) y 0,02% azida sódica a 4 °C. Las células pretratadas con el anticuerpo no conjugado se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con suero de cabra anti-Ig de ratón conjugado con FITC. Después de 3 lavados con BFS 1X en presencia de 1% ASB y 0,02% azida sódica, posteriormente, las células fueron resuspendidas en BFS 1X a 4 °C y posteriormente analizadas en un citómetro de flujo. Como control negativo para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta se utilizaron células marcadas con el suero de cabra anti-Ig de ratón conjugado a FITC. Para los ensayos de inmunofluorescencia directa las células fueron marcadas con una inmunoglobulina murina conjugada a FITC, del mismo isotipo del AcM específico. Las concentraciones de los anticuerpos utilizados se encuentran especificadas en la Tabla 2 del apéndice.

El citómetro utilizado fue un CoulterEpics® XL (BeckmanCoulter, Inc. CA, EUA) ubicado en el Instituto de Inmunología perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV) bajo la supervisión y colaboración de la Lic. Perla Chirinos.

### **Lisis de linfocitos T**

Las suspensiones celulares previamente estimuladas o no, se centrifugaron a 13000 x g durante 20 segundos y el botón celular fue resuspendido inmediatamente en 10 µL de buffer de lisis IGEPAL® al 1 % (nonil fenoxipolietoxietanol). Éste es un detergente no iónico que se utiliza para el aislamiento de complejos de membrana funcionales. Las suspensiones fueron incubadas durante 15 minutos en hielo. Luego, se centrifugaron las muestras a 13000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se separó la fracción soluble al detergente contenida en el sobrenadante y se le agregó 5 µL de buffer cargador 4x antes de congelarla a -70 °C.

### **Inmunoblot**

La tendencia en la investigación de CMSP por la técnica de inmunoblot suele utilizar un número finito y constante de células en suspensión, lo que corresponde a una carga proteica estándar que permite evaluar la expresión de proteínas (Liopsis y col., 1998; Enyedi y col., 2001). Los lisados celulares almacenados ( $2,5-10 \times 10^6$  LT) a -70 °C fueron incubados en baño de María (100 °C) durante 5 minutos y centrifugados durante 15 segundos antes de separarlos electroforéticamente en geles SDS-PAGE (7,5, 10 y 12%) hasta que llegaron al frente de corrida a 100 V. Los geles fueron humedecidos en buffer de transferencia pH 8 para luego electrotransferirlos en frío a membranas PVDF (fluoruro de polivinilideno) durante 1 hora a 100 V. Las membranas PVDF fueron coloreadas durante 5 minutos con Ponceau S, para estimar la eficiencia de la transferencia.



Las membranas PVDF fueron bloqueadas durante 1 hora con la solución de bloqueo A (leche descremada 3%, BFS y tween-20 0,1%) para AcM o la solución de bloqueo B (leche descremada 5%, buffer tris salino (BTS) y tween-20 0,05%) para AcP según el anticuerpo a utilizar (Tabla 3 del apéndice). Se incubó a continuación el anticuerpo deseado diluido adecuadamente en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a -4 °C, y posteriormente durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas según los protocolos recomendados por las casas comerciales de los anticuerpos, y se incubaron las mismas con el anticuerpo secundario específico durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente, las membranas PVDF fueron lavadas adecuadamente para eliminar el exceso del anticuerpo secundario y se revelaron mediante quimioluminiscencia con SuperSignal® West Pico.

Las películas radiográficas fueron digitalizadas con el equipo Gel-Doc™ 2000 (Bio Rad, USA) ubicado en el Laboratorio de Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central De Venezuela (UCV) con la colaboración de la Dra. Sandra Alva. La densidad de las bandas fueron cuantificadas (DO) con el programa Image Lab (Bio Rad, USA).

### **Microscopía confocal**

Láminas portaobjetos de 6 pozos fueron tratadas con una solución 90% etanol y 1% HCl durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se dejaron escurrir y secar, donde a cada pozo se le añadió 50 µL de poli-L-lisina a 1 mg/mL. Se dejó secar la solución durante toda la noche a temperatura ambiente.

Los linfocitos T a ser estudiados fueron estimulados o no utilizando una proporción 1:2 de perlas paramagnéticas recubiertas con poliestireno que en su superficie tienen una mezcla de anticuerpos monoclonales contra las moléculas de superficie CD3 y CD28 humano (Dynabeads® *MagneticBeads CD3/CD28 T Cell expander*). Se utilizaron estas

perlas para simular una célula presentadora de antígeno.

Se centrifugaron las células en presencia de las perlas durante 1 minuto a 400 x g a temperatura ambiente. Se agregaron  $7,5 \times 10^4$  células conjugadas a las perlas a los pozos respectivos, y se colocaron las láminas en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se adhirieron a la superficie, y luego se procedió a colocar cada lámina en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> considerando desde este instante los tiempos respectivos de estimulación a evaluar. Inmediatamente, se agregó 25 µL/pozo de una solución fresca de PFA al 6% diluido en BFS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados 3 veces con 50 µL de solución de lavado compuesto por 3% ASB y 10 mM HEPES diluido en BFS 1X.

Las células ya fijadas fueron permeabilizadas con 25 µL/pozo de Triton X-100 al 0,1% diluido en BFS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con la solución de lavado y uno con BFS 1X.

Para disminuir el grado de inespecificidad de los anticuerpos utilizados, se incubó cada pozo con 20 µL de una dilución 1/20 de suero de cabra en solución de lavado durante 30 minutos. Luego, se lavaron las células 3 veces con solución de lavado y se procedió a incubarlas durante 30 minutos con 20 µL/pozo de concentraciones adecuadas de los anticuerpos primarios pertinentes diluidos en solución de lavado. Fueron lavadas 3 veces con solución de lavado y se incubó durante 30 minutos en cámara húmeda oscura a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario diluido en la solución de lavado alcanzando una concentración óptima previamente establecida. Se realizaron 2 lavados con solución de lavado y 1 vez con BFS 1X. Las concentraciones de los anticuerpos utilizados se encuentran en la Tabla 4 del apéndice.

Para preservar y proteger la fluorescencia de los anticuerpos conjugados se agregaron 2 µL/pozo de Mowiol, se cubrió la placa con un cubre objetos y se sellaron los bordes con pintura de uña transparente para mantener la humedad de la muestra. Las

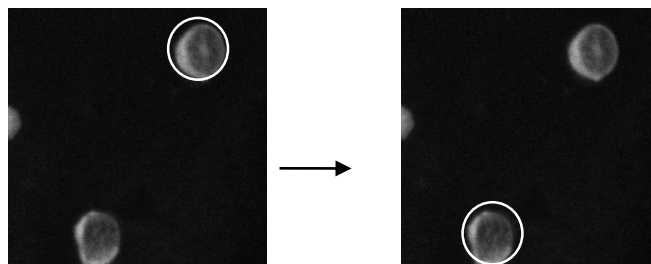
placas fueron almacenadas en cámara húmeda oscura en frío hasta el momento de su análisis en el microscopio confocal Olympus FluoView™ FV1000 Confocal Microscope en el Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela, bajo la supervisión y colaboración del Lic. Hector Rojas.

Para observar la fluorescencia verde (Alexa 488) indicando la expresión del glangliósido GM1, que se encuentra enriquecido en las balsas lipídicas, se utilizó el láser de Argón de 473 nm para excitar la preparación y el canal de detección se ubicó entre 520-580 nm. Para observar la fluorescencia roja (Cy3) indicando la expresión de Syk, el láser a utilizar para excitar la preparación fue el de Helio-Neón de 559 nm y el canal de detección se ubicó entre 567-622 nm. Para observar la fluorescencia azul (Alexa 647) indicando la expresión de ZAP-70, se utilizó el láser de Helio-Neón para excitar la preparación a 635 nm y el canal de detección se ubicó entre 688-755 nm. La ganancia para cada uno de los detectores fue ajustada al inicio de cada sesión para la lectura de cada experimento y se mantuvo en ese valor hasta la culminación de la sesión de lectura en el microscopio confocal.

Para el análisis del co-marcaje, las imágenes fueron obtenidas de forma secuencial barriendo la muestra primero con un láser y detectando la fluorescencia emitida por el fluorocromo respectivo y posteriormente barriendo la muestra con el siguiente láser detectando la fluorescencia del segundo fluorocromo, procediendo de la misma manera para el tercer fluorocromo, evitando así el solapamiento de las emisión de los fluorocromos que pudiera generar falsos positivos.

El análisis de las imágenes obtenidas y de las células contenidas en ellas (se consideró en el análisis un mínimo de 50 células por condición), fue realizada con el software gratuito disponible en línea Image J, versión 1.6 de Wayne Rasband, National Institutes of Health (NIH), USA. Para ello, se convirtieron las imágenes a color a blanco y negro, se seleccionó cada célula en una misma imagen encerrándola en un círculo y se determinó el

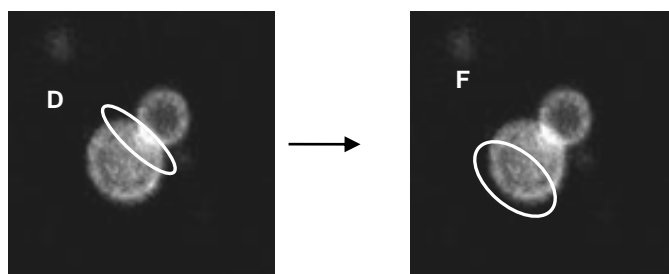
valor de la IMF (intensidad media de fluorescencia). El círculo fue arrastrado a la siguiente célula y así sucesivamente hasta poder abarcar todas las células que estaban contenidas en la imagen (Figura 5). Paralelamente, comparamos estos resultados con el análisis obtenido utilizando el software del equipo Olympus FluoView™ FV1000 Confocal microscope con la finalidad de corroborar los resultados.



**Figura 5.** Ilustración de la selección de linfocitos T para determinar la IMF con el programa Image J, NIH, USA.

La colocación de las imágenes obtenidas fue determinada con el software Image J, el cual analiza el grado de colocación en la totalidad de la imagen en blanco y negro para cada fluorocromo y comparamos estos resultados con los obtenidos utilizando el software del equipo.

En el caso del análisis de la sinapsis inmunitaria, los valores de la IMF dentro de la sinapsis (D) fueron realizados colocando un óvalo alrededor de la región donde se polarizaron las moléculas o en caso de que no ocurriera polarización en una mitad de la célula, y fuera de la sinapsis (F) colocando un óvalo alrededor de la región restante de la célula. La IMF de cada óvalo fue determinada de manera independiente (Figura 6).



**Figura 6.** Ilustración de la determinación de la IMF dentro (D) y fuera (F) de la sinapsis inmunitaria en un linfocito T utilizando el programa Image J, NIH, USA.

### **Análisis Estadísticos**

Para el análisis de variables continuas, donde se compararon las respuestas en linfocitos T de controles y pacientes, se utilizó la prueba paramétrica *t* de Student de dos colas para muestras no pareadas. Se utilizó la misma prueba de dos colas para comparar las respuestas inducidas por la estimulación dentro del mismo grupo de observación, pero en este caso para muestras pareadas.

La prueba ANOVA de una vía fue utilizada para comparar las cinéticas de las respuestas de los linfocitos T de controles sanos y pacientes con LES.

La prueba de Pearson Rr fue utilizada para evaluar la correlación entre dos moléculas colocalizadas o no en un mismo espacio físico después de realizados los experimentos con el Microscopio Confocal. El valor del coeficiente oscila entre 1 y -1, donde 1 indica colocalización total, -1 indica exclusión total y 0 indica localización aleatoria de la colocalización. Se utilizó un intervalo de confianza del 90%.

Para cada una estas pruebas, se consideró como significativo una  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

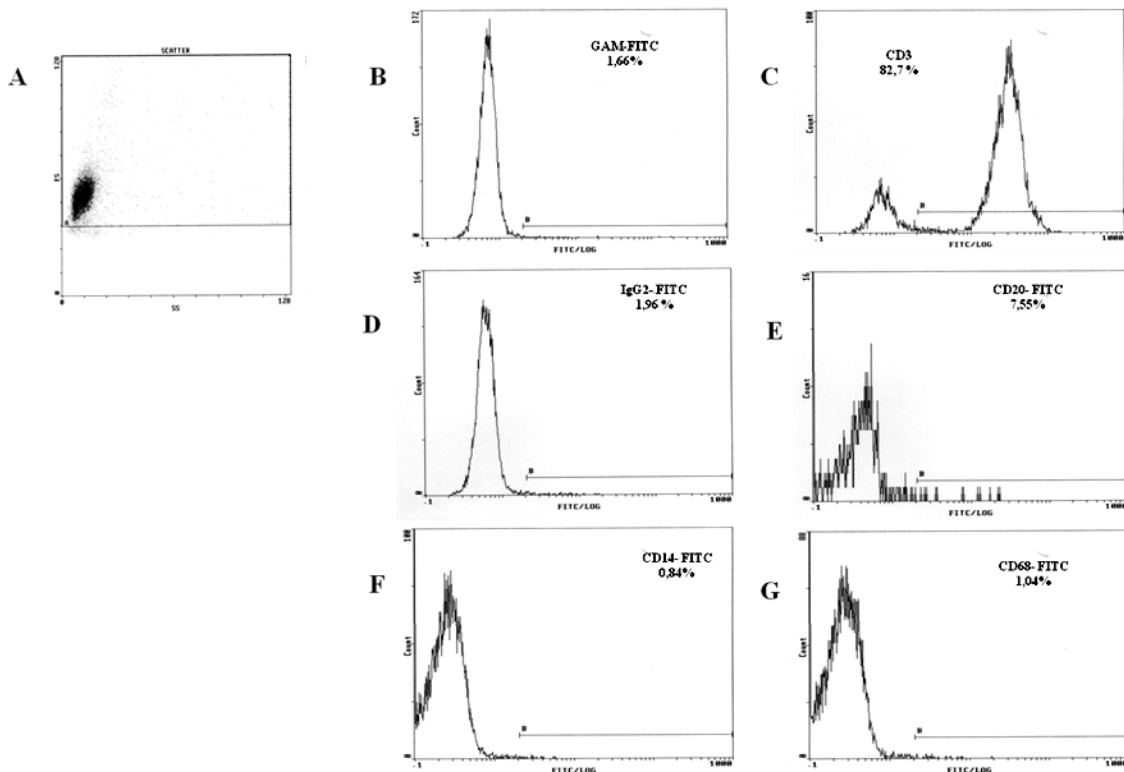
### ***Pureza de linfocitos T obtenidos mediante la técnica de RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail, por citometría de flujo***

Considerando que en este proyecto de investigación evaluamos eventos de señalización que ocurren en linfocitos T de sangre periférica, procedimos a aislarlos utilizando un kit comercial *RosetteSep™*, el cual consiste en incubar CMSP con un *cocktail* de anticuerpos y eritrocitos autólogos para eliminar por selección positiva las células no deseadas a través de un gradiente de Ficoll.

Con la finalidad de evaluar la pureza de nuestra población celular enriquecida en linfocitos T, utilizamos la técnica de citometría de flujo la cual permite caracterizar poblaciones celulares y determinar la expresión de moléculas de superficie e intracelulares. Para ello,  $0,5 \times 10^6$  LT fueron incubados con una dilución óptima de anticuerpos monoclonales conjugados o no a FITC (inmunofluorescencia directa o indirecta, respectivamente). Dichos anticuerpos reconocen diversos marcadores expresados en la superficie de las células mononucleares. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 no conjugado a FITC; anti-CD14, anti-CD20 y anti-CD68 conjugados a FITC. Como control negativo para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se utilizó una inmuglobulina múrida conjugada a FITC, del mismo isotipo del AcM anti-CD3, y para los ensayos de inmunofluorescencia directa (IFD) se utilizó un suero de cabra anti-Ig de ratón conjugado a FITC (IgG2a).

En la figura 7A se muestra un diagrama de dispersión donde la zona de puntos más densa, región con menor tamaño y granularidad, corresponde a los LT. Arriba a la derecha se ubica la región de los granulocitos, mientras que los monocitos se ubican entre ambas zonas. Como control negativo para evaluar la inespecificidad dada por el anticuerpo secundario, se evaluó la reactividad/"background" del anticuerpo secundario GAM-FITC (Fig.

7B) el anticuerpo reconoció el 1,66% de nuestra población enriquecida en LT. Se utilizó el AcM anti-CD3 para evaluar la pureza de LT. La molécula CD3 es un co-receptor que forma parte del receptor de linfocitos T que permite acoplar el reconocimiento antigénico a eventos de señalización intracelular. Como observamos en la figura 7C, se obtuvo una pureza de LT de 83%. Al realizar el control de isotipo con IgG2a (Fig. 7D) se obtuvo una positividad de 2%. Para determinar la presencia de linfocitos B, se utilizó el AcM anti-CD20. CD20 es una molécula involucrada en la regulación de la activación y diferenciación de los LB. Para determinar la presencia de macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos y células NK se utilizó el AcM anti-CD68, y además el AcM anti-CD14 para detectar la presencia de monocitos y granulocitos. Los resultados muestran una contaminación por células mononucleares, en su mayoría linfocitos B (8%) (Fig. 7E), seguido de macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos y células NK (1%) (Fig. 7G); y monocitos y granulocitos (0,84%) (Fig.7F).



**Figura 7. Pureza de linfocitos T aislados de sangre periférica por la técnica de RosetteSep™, analizados por citometría de flujo.** Los LT fueron aislados a partir de sangre periférica heparinizada utilizando el kit *RosetteSep™*.  $0,5 \times 10^6$  LT por punto fueron marcadas con diferentes combinaciones de anticuerpos que permiten identificar su fenotipo. Las células fueron analizadas en un citómetro CoulterEpics® XL. **A.** Diagrama de dispersión de la muestra. El eje vertical indica la dispersión lateral (granularidad de las células), mientras que el horizontal indica la dispersión frontal (tamaño). La zona de puntos densa corresponde a la población de LT. **B.** Histograma de células incubadas con el AcM anti-GAM-FITC (control negativo IFI). **C.** Histograma de células incubadas con el AcM anti-CD3 y anti-GAM-FITC como anticuerpo secundario. **D.** Histograma de células incubadas con el AcM anti-IgG2a-FITC (control negativo IFD). **E.** Histograma de células incubadas con el AcM anti-CD20-FITC. **F.** Histograma de células incubadas con el AcM anti-CD14. **G.** Histograma de células incubadas con el AcM anti-CD68-FITC. El porcentaje de células positivas para el marcador correspondiente se muestra en cada histograma.



***Expresión de ZAP-70 en lisados totales de linfocitos T estimulados vía TCR/CD3-CD28, de controles sanos y pacientes con LES mediante la técnica de Western blot.***

La PTK ZAP-70 es una quinasa de la familia *Syk*, que es reclutada a los ITAMs fosforilados de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR/CD3, donde es fosforilada y activada, fosforilando así a un conjunto de moléculas cascada abajo, entre ellas, Cbl, SLP-76, Vav, PLC $\gamma$ 1 y LAT, lo que conlleva a la formación del signalosoma y posteriormente a la activación de la cascada de las MAPKs (Chu y col., 1998). En LT de pacientes con LES hay una menor expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR/CD3 (Brundula y col., 1999), por lo que ocurre un “recableado” de la señalización vía TCR/CD3 donde la cadena  $\zeta$  del complejo CD3 es sustituida por FcR $\gamma$ , y ZAP-70 es a su vez sustituida por la PTK *Syk* (Krishnan y col., 2008; Kytтарis, 2010).

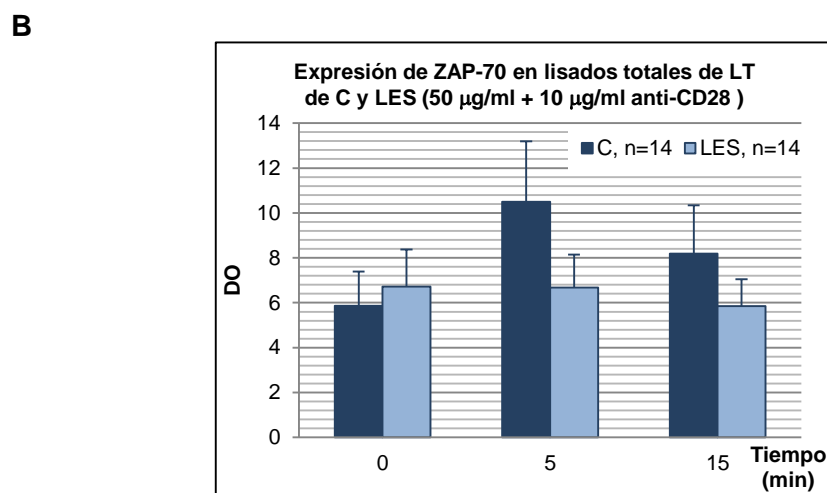
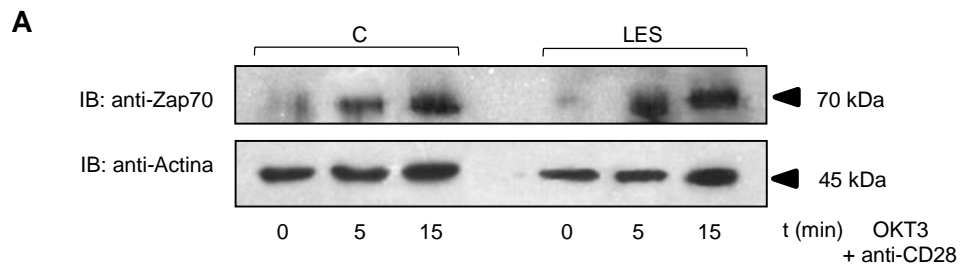
Con la finalidad de evaluar la expresión de la PTK ZAP-70 por Western blot, en lisados totales de LT de pacientes con lupus que acuden a la consulta de Reumatología del Hospital Universitario de Caracas, y controles sanos, procedimos a estandarizar las condiciones óptimas para la determinación de la expresión de esta proteína. Para ello, evaluamos diferentes cantidades de células (2,5 – 10x10<sup>6</sup>), así como concentraciones variables del AcP anti-ZAP-70 y del GAR-HRP. Con estos experimentos pudimos determinar la concentración adecuada de los anticuerpos a utilizar (Tabla 3) y el número de células apropiado para evaluar la expresión de esta molécula, 5x10<sup>6</sup> LT.

LT de sangre periférica fueron aislados con el kit *RossetteSep*<sup>TM</sup>. 5x10<sup>6</sup> LT fueron estimulados o no con 50  $\mu$ g/ml OKT3 y 10  $\mu$ g/ml anti-CD28, previamente determinadas en el laboratorio como las concentraciones óptimas para la visualización de los eventos de señalización temprana a estudiar, en placas multipozo pretratadas con 10  $\mu$ g/ml GAM. Los LT fueron lisados con IGEPAL® al 1% y los clarificados celulares fueron corridos en geles SDS-PAGE al 12% y electrotransferidos en frío a membranas de PVDF. Se realizaron

inmunoblots con el AcP anti-ZAP-70 y el AcP anti-actina como control de carga. La densidad óptica (DO) de las bandas reveladas fue obtenida por densitometría de barrido.

En la figura 8A se muestra un inmunoblot representativo de lisados totales de LT de un control sano y un paciente con LES donde ZAP-70 migra con un P<sub>Ma</sub> (peso molecular aparente) de 70 kDa. Su expresión incrementa proporcionalmente con el tiempo de estimulación, 5 y 15 minutos, tanto en el control sano como en el paciente con LES, siendo a su vez relativamente similar en el control y en el paciente en cada punto de estimulación. La expresión de la actina, una proteína que forma parte del citoesqueleto, utilizada como control de carga proteica que migra con P<sub>Ma</sub> de 45 kDa, fue similar en los lisados celulares del control sano y del pacientes con LES.

En la figura 8B se corrobora la observación anterior al graficar el promedio de la DO de 14 experimentos de lisados totales de linfocitos T de controles sanos, donde la expresión de ZAP-70 tiende a incrementar al estimular durante 5 minutos y mantenerse al estimular durante 15 minutos, vía TCR/CD3-CD28. Esta tendencia en la cinética de estimulación del control no fue estadísticamente significativa. En cuanto a los pacientes con LES evaluados en 14 experimentos, el promedio de las DO no parecen variar con la estimulación, y tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al igual que al comparar las DO de controles y pacientes en LT sin estimular y estimulados durante 5 y 15 minutos.



**Figura 8. Expresión de ZAP-70 en lisados totales de linfocitos T estimulados o no por la vía TCR/CD3-CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por inmunoblot.**  $5 \times 10^6$  LT fueron estimulados o no con 50  $\mu$ g/ml de OKT3 y 10  $\mu$ g/ml de anti-CD28, lisados con IGEPAL® al 1% en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados fueron corridos en geles SDS-PAGE al 12 % y electrotransferidos en frío a membranas PVDF. Las membranas fueron incubadas con el AcP anti-ZAP-70 y el AcP anti-actina. **A.** Experimento representativo de la expresión de ZAP-70 y actina en LT de un control sano y un paciente con LES. **B.** Gráfica de las medias de las DO  $\pm$  ESM de la proteína que migra con PMA similar a ZAP-70 (70 kDa).

***Expresión de Syk en lisados totales de linfocitos T estimulados vía TCR/CD3-CD28, de controles sanos y pacientes con LES mediante la técnica de Western blot.***

Syk es una PTK citoplasmática perteneciente a la familia Syk, que se encuentra expresada en LB, mastocitos, neutrófilos, macrófagos y plaquetas, siendo importante en la transducción de señales (Pamuk y Tsokos, 2010) iniciadas por inmunoreceptores, tales como el BCR, receptores Fc y receptores de células NK. Esta quinasa se asemeja en estructura y función a ZAP-70, compartiendo un 57% de homología en su secuencia (Latour y col., 1997). En LT de pacientes con LES ocurre un “recableado” de la señalización vía TCR/CD3, donde la expresión disminuida de la cadena  $\zeta$  del complejo CD3 es sustituida por el receptor Fc $\gamma$ , las cuales se asocian con ZAP-70 o Syk, respectivamente, para suplir la transducción de señales cascada abajo (Brúndula y col., 1999; Krishnan y col., 2008; Kytтарis, 2010).

Con la finalidad de evaluar la expresión de la Syk por Western blot, en lisados totales de LT de pacientes con lupus y controles sanos, procedimos a estandarizar las condiciones óptimas para la determinación de la expresión de esta proteína. Para ello, estudiamos diferentes cantidades de células para realizar los lisados de LT ( $2,5 - 10 \times 10^6$ ), así como concentraciones variables del AcM anti-Syk y GAM-HRP. Con estos experimentos pudimos determinar la concentración adecuada de los anticuerpos a utilizar (Tabla 3) y el número de células apropiado para evaluar la expresión de esta molécula,  $5 \times 10^6$  LT.

Linfocitos T de sangre periférica fueron aislados con el kit *RossetteSep*<sup>TM</sup>.  $5 \times 10^6$  LT fueron estimulados o no con 50  $\mu\text{g/ml}$  OKT3 y 10  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD28, previamente determinadas en el laboratorio como las concentraciones óptimas para la visualización de los eventos de señalización temprana a estudiar, en placas multipozo pretratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  GAM. Los LT fueron lisados con IGEPAL® al 1% y los clarificados celulares fueron

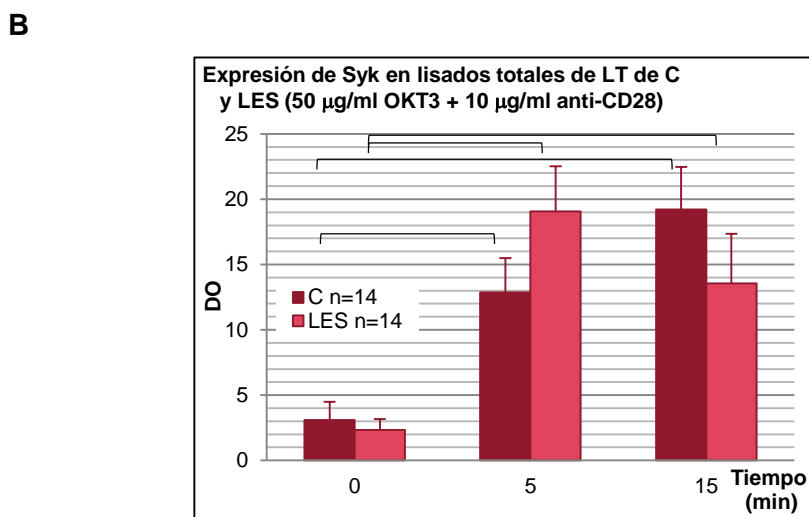
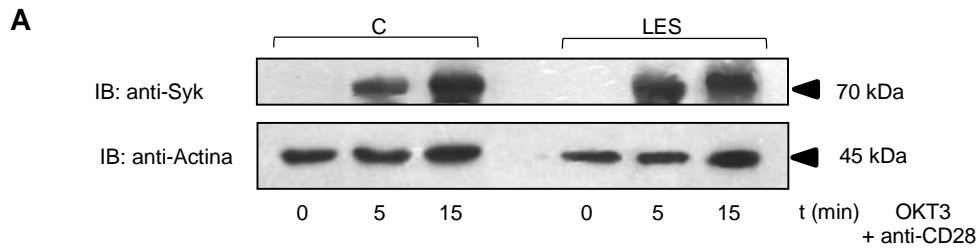
corridos en geles SDS-PAGE al 12% y electrotransferidos en frío a membranas de PVDF. Se realizaron inmunoblots con el AcM anti-Syk y el AcP anti-actina como control de carga. La DO de las bandas reveladas fue obtenida por densitometría de barrido.

En la figura 9A se muestra un inmunoblot representativo de lisados totales de LT de un control sano y un paciente con LES donde Syk migra con un PMA de 65 kDa. Su expresión incrementa proporcionalmente con el tiempo de estimulación, 5 y 15 minutos en el control sano, mientras que en el pacientes con LES parece mantenerse durante el tiempo de estimulación, siendo casi nula en LT sin estimular tanto del control como del paciente. Además, la expresión de Syk es relativamente similar en el control y el paciente en cada punto de estimulación. La expresión de la actina, utilizada como control de carga proteica que migra con PMA de 45 kDa, fue similar en los lisados celulares del control sano y del pacientes con LES.

En la figura 9B se corrobora la observación anterior al graficar el promedio de la DO de 14 experimentos de lisados totales de linfocitos T de controles sanos, donde la expresión de Syk fue muy baja en LT no estimulados e incrementa progresivamente al estimular durante 5 y 15 minutos, vía TCR/CD3-CD28. Esta tendencia en la cinética de estimulación del control fue estadísticamente significativa al comparar células no estimuladas y estimuladas durante 5 (*t* Student,  $p=0,001$ ) y 15 minutos (*t* Student,  $p=0,005$ ). Al realizar un ANOVA de una vía para comparar la expresión de Syk en LT de controles con respecto a los tiempos de estimulación (0, 5 y 15 minutos) se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,030$ ).

En cuanto a la expresión de Syk en LT de pacientes con LES, en 14 experimentos analizados figura 9B, observamos que el promedio de la DO en LT no estimulados fue muy baja e incrementa considerablemente a los 5 minutos de estimulación, presentando una diferencia estadísticamente significativa (*t* Student,  $p=0,001$ ). A los 15 minutos, la expresión

de Syk disminuye ligeramente manteniéndose una diferencia estadísticamente significativa con respecto a LT no estimulados ( $t$  Student,  $p=0,027$ ). Al realizar un ANOVA de una vía para comparar la expresión de Syk en LT de pacientes con LES con respecto a los tiempos de estimulación (0, 5 y 15 minutos) se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,005$ ).



**Figura 9. Expresión de Syk en lisados totales de linfocitos T estimulados o no por la vía TCR/CD3-CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por inmunoblot.**  $5 \times 10^6$  LT fueron estimulados o no con 50  $\mu$ g/ml de OKT3 y 10  $\mu$ g/ml de anti-CD28, lisados con IGEPAL® al 1% en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados fueron corridos en geles SDS-PAGE al 12 % y electrotransferidos en frío a membranas PVDF. Las membranas fueron incubadas con el AcM anti-Syk y el AcP anti-actina. **A.** Experimento representativo de la expresión de Syk y actina en lisados totales de LT de un control sano y un paciente con LES. **B.** Gráfica de las medias de las DO  $\pm$  ESM de la proteína que migra con PMA similar a Syk (65 kDa). Se utilizó el test *t* de Student de dos colas pareado,  $p < 0,05$ .

***Evaluación de la expresión de ZAP-70, Syk y GM1, en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.***

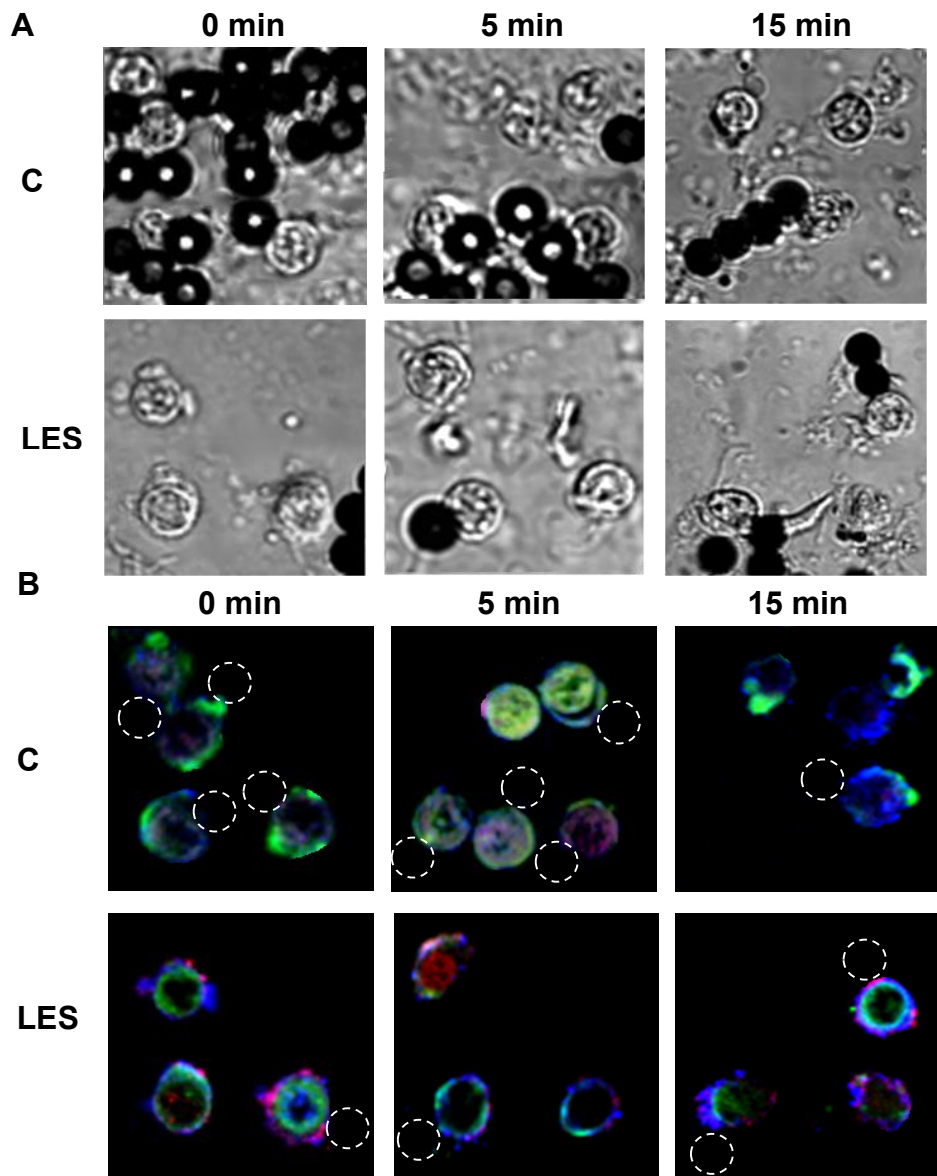
Con la finalidad de evaluar la expresión de Syk y ZAP-70 y su colocalización con el gangliósido GM1 como marcador de las balsas lipídicas, estandarizamos las condiciones óptimas para la visualización de estas moléculas en LT de controles sanos y pacientes con LES. Para ello,  $7,5 \times 10^4$  linfocitos T fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas paramagnéticas recubiertas de poliestireno que en su superficie tienen una mezcla adecuada de anticuerpos monoclonales contra las moléculas de superficie CD3 $\epsilon$  y CD28 humano. Se agregaron las células conjugadas con las perlas a láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y fueron estimuladas o no a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas y permeabilizadas e incubadas con los anticuerpos primarios y secundarios pertinentes a concentraciones previamente estandarizadas (Tabla 4) y por último, se agregó Mowiol. Finalmente, las placas fueron almacenadas en cámara húmeda oscura y posteriormente visualizadas en el microscopio confocal.

En la figura 10A, se muestran campos representativos de un experimento con LT de un control sano y un paciente con LES, en presencia de las perlas estimuladoras, en la que las imágenes fueron tomadas con DIC (del inglés *differential interference contrast*, contraste de interferencia diferencial) para ubicar puntualmente a las células de interés. Estos campos son los mismos que se muestran marcados con los diferentes fluorocromos (ver más adelante) identificando así las moléculas a ser evaluadas (ZAP-70, Syk y GM1).

En la figura 10B, se muestran los mismos campos representativos de la figura 10A en la que se puede observar la colocalización de las tres moléculas evaluadas (ZAP-70, Syk y GM1) de manera simultánea en LT de un control sano y un paciente con LES. En vista de que estas imágenes son difíciles de analizar por la complejidad entre las interacciones de los



tres fluorocromos, más adelante se describen los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de cada molécula por separado y la colocación entre pares de moléculas.



**Figura 10. Visualización de LT estimulados o no con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, en un control sano y un paciente con LES, por microscopía confocal.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con los anticuerpos primarios y secundarios pertinentes. **A.** Imágenes representativas de la ubicación de los LT de un control sano y un paciente con LES por DIC. **B.** Imágenes representativas de la colocalización entre ZAP-70, Syk y GM1, en LT de un control sano y un paciente con LES. Los LT fueron inmunomarcados con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL) (azul), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) (rojo) y CTB-A488 (10 µg/mL) (verde). El círculo punteado indica una perla representativa en la imagen.

***Expresión del gangliósido GM1 enriquecido en las balsas lipídicas, en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal***

A través de la microscopía confocal es posible semi-cuantificar y por lo tanto determinar la expresión relativa de moléculas en una muestra biológica. Para la cuantificación de la expresión de una molécula, es necesario tomar imágenes de la fluorescencia emitida por los fluorocromos marcadores de la muestra, convertirlas a imágenes en blanco y negro de 8 bit de resolución y a partir de allí, con el uso de un programa informático, cuantificar la intensidad media de la fluorescencia (IMF) de cada fluorocromo.

Considerando que ZAP-70, entre otras numerosas moléculas como la cadena  $\zeta$  del TCR, Lck, Fyn, el complejo LAT/Grb2/SLP-76/Sos, requieren de su ubicación y/o translocación a las balsas lipídicas para garantizar la transducción de señales cascada abajo, investigamos la localización de ZAP-70 y Syk, en estos microdominios de membrana, conocidas como balsas lipídicas (Jury y col., 2007). En ellas, moléculas que intervienen en la fase temprana de la señalización mediada por el TCR, se agrupan promoviendo la formación de plataformas de transducción de señales cruciales para la activación de los LT.

Se ha demostrado que las balsas lipídicas de LT de pacientes con LES poseen una composición alterada de moléculas que interrumpen vías de señalización intracelulares y afectan la función de las mismas (Kabouridis y col., 1997; Zhang y col., 1998; Xavier y col., 1998; Montixi y col., 1998; Kabouridis y col., 2005). Algunas de estas alteraciones son: incremento en la expresión de FcR $\gamma$ , Syk, PLC $\gamma$ 1, con una disminución en la expresión de Lck (Jury col., 2003; Jury y col., 2004; Krishnan y col., 2004; Kabouridis y col., 2008) y LAT (Abdoel y col., 2012).

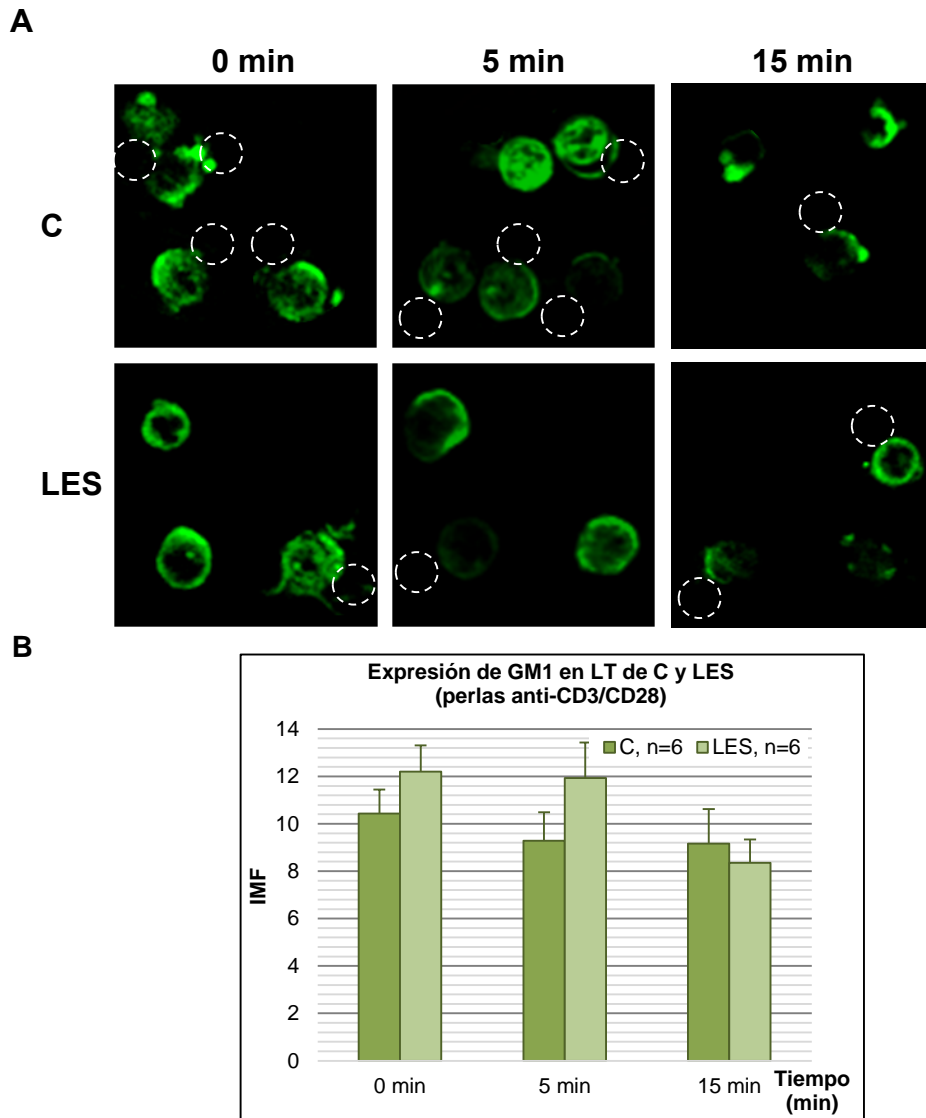
En la figura 11A, se muestran imágenes representativas de la expresión de GM1 en LT de un control sano y un paciente con LES, inmunomarcados con CTB-A488

(fluorescencia verde), ampliamente utilizado como un marcador de balsas lipídicas puesto que el gangliósido se encuentra enriquecido en ellas. GM1 se localiza de manera periférica e intracitoplasmática en las células del control y el paciente, formando un anillo bien definido y polarizándose en algunas células al estimular vía TCR/CD3-CD28 utilizando las perlas. En el panel superior se pueden observar LT del control sano, donde la expresión de GM1 parece disminuir gradualmente con la estimulación de las células. En el panel inferior, se observa el mismo efecto de la estimulación sobre LT del paciente con LES, en la cual el GM1 tiende a disminuir con la estimulación.

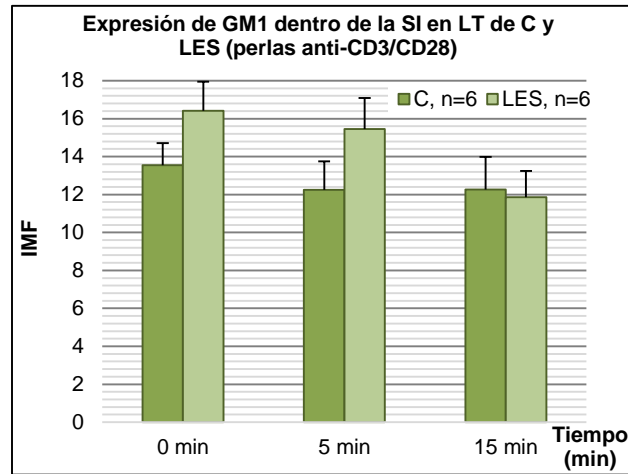
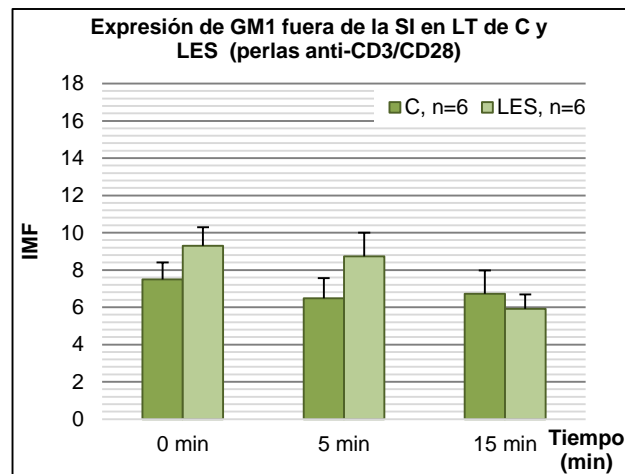
En la figura 11B, se muestra el promedio de la IMF obtenida del análisis de 6 experimentos con controles sanos y 6 experimentos con pacientes con LES. Se pueden corroborar las observaciones anteriores (Fig. 11A) donde tanto en controles como en pacientes la expresión de GM1 tiende a disminuir con el incremento de los tiempos de estimulación, en mayor grado en LT de pacientes con LES que en LT de controles sanos. Sin embargo, estas tendencias no fueron estadísticamente significativas ni al comparar la IMF en controles versus pacientes en cada punto de estimulación.

En las figuras 12A y B, respectivamente, se aprecia la gráfica de los promedios de la IMF dentro y fuera de la sinapsis simulada *in vitro*, en LT de controles sanos y pacientes con LES. Esta observación se logra encerrando en un óvalo la región de la célula cuya IMF se quiere determinar, bien sea dentro o fuera de la sinapsis conociendo como sinapsis la región de contacto entre la célula y la perla, en este caso, con la finalidad de determinar si ocurren cambios en la dinámica de la localización de las diferentes moléculas estudiadas. En cuanto a GM1 dentro y fuera de la sinapsis, se observa que éste presenta la misma cinética observada en la célula total, donde en controles y en pacientes, el GM1 tiende a disminuir progresivamente con la estimulación en ambas regiones, sin alcanzar diferencias

estadísticamente significativas ni entre controles ni pacientes en cada tiempo de estimulación.



**Figura 11. Expresión de GM1 en linfocitos T estimulados o no con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, en un control sano y un paciente con LES, por microscopía confocal.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Imágenes representativas de la expresión de GM1 (verde) en LT de un control sano y un paciente con LES. Las imágenes son producto de un barrido secuencial con los láseres de excitación pertinentes. Se utilizó el láser de Argón de 473 nm y el canal de detección se ubicó entre 520 - 580 nm. **B.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM para GM1 obtenida con el programa Image J al analizar un mínimo de 50 células por condición. El círculo punteado indica una perla representativa en la imagen.

**A****B**

**Figura 12. Expresión de GM1 dentro y fuera de la sinapsis inmunitaria en linfocitos T estimulados o no con perlas anti-CD3/anti-CD28, de controles sanos y pacientes con LES.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM dentro de la sinapsis para GM1. **B.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM fuera de la sinapsis para GM1. Un mínimo de 50 células por condición fue analizado utilizando el programa Image J.

***Expresión de ZAP-70 en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal***

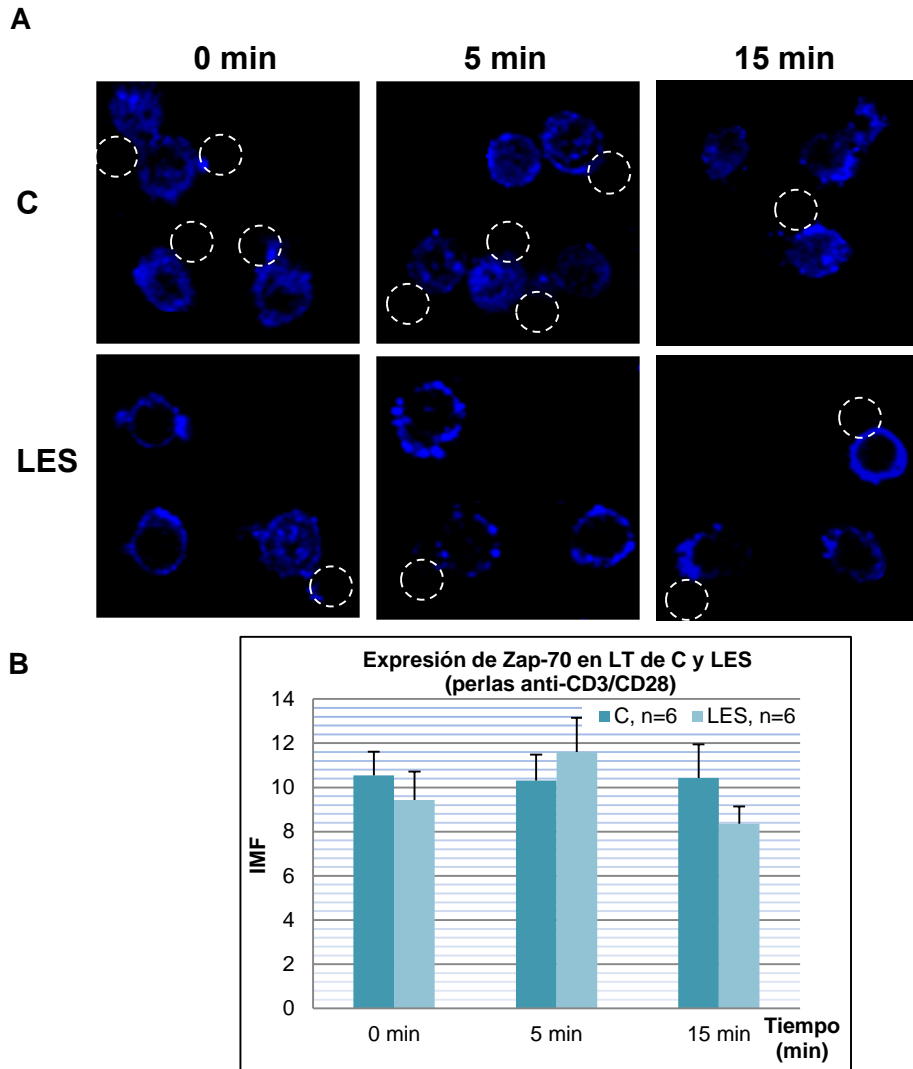
En la figura 13A, se muestra un experimento representativo donde se observa la fluorescencia resultante del marcaje de LT con el AcP anti-ZAP-70 y el anticuerpo secundario GAR-A647 (fluorescencia azul), de un control sano y un paciente con LES. ZAP-70 parece localizarse en forma de un anillo en la periferia de las células y en algunas de ellas el marcaje es también citoplasmático. En el panel superior se muestra la expresión de ZAP-70 en LT de un control sano, donde se puede apreciar que esta molécula no parece variar su expresión con los diferentes tiempos de estimulación, y al estimular ocurre una ligera polarización de la molécula en algunas células. En el panel inferior, se muestra la expresión de ZAP-70 en LT de un paciente con LES, donde en células estimuladas durante 5 minutos la expresión de ZAP-70 parece ser ligeramente mayor que en células no estimuladas, volviendo a un nivel basal al estimular durante 15 minutos. De manera similar a las células del control sano, al estimular vía TCR/CD3-CD28, pareciera ocurrir una ligera polarización de la molécula en algunas células. Al observar la fluorescencia correspondiente entre el control y el paciente, pareciera que en células no estimuladas del paciente hay una menor cantidad relativa de ZAP-70, al igual que a los 15 minutos de estimulación.

En la figura 13B, se reflejan las observaciones anteriores, al analizar la expresión de ZAP-70 por microscopía confocal, en LT de 6 controles sanos y 6 pacientes con LES. El promedio de la IMF es relativamente similar en LT de controles sanos al incrementar los tiempos de estimulación, no mostrando diferencias estadísticamente significativas. El promedio de la IMF incrementa levemente en los LT de pacientes con LES al estimular durante 5 minutos, y disminuye a un nivel menor que el basal, sin embargo no se encontraron diferencias significativas al comparar con las células no estimuladas. En línea general, la expresión de ZAP-70 en controles y pacientes no sufrió cambio alguno con la

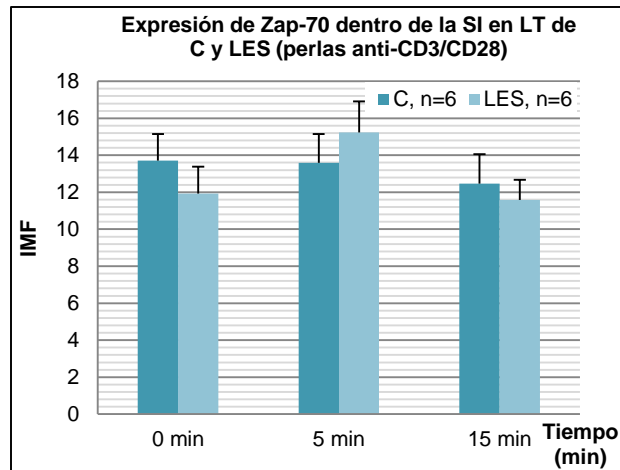
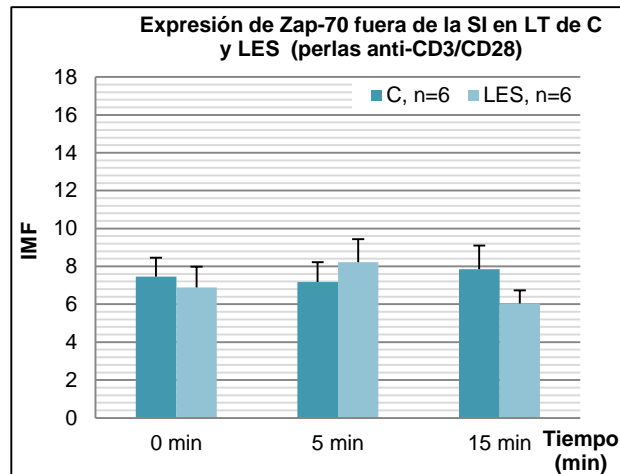


estimulación ni hubo variaciones entre los grupos, es decir, controles versus pacientes en cada tiempo de estimulación.

En las figuras 14A y B, respectivamente, se aprecia la gráfica de los promedios de la IMF dentro y fuera de la sinapsis simulada *in vitro*, en LT de controles sanos y pacientes con LES. La IMF de ZAP-70 dentro y fuera de la sinapsis presenta una cinética similar a la observada en la célula total, donde en controles la IMF de ZAP-70 no presenta cambios con la estimulación en ambos compartimientos y por lo tanto no arroja diferencias estadísticamente significativas. En pacientes con LES, tanto dentro como fuera de la sinapsis, la IMF incrementa levemente al estimular durante 5 minutos, y disminuye a un nivel cercano el basal, sin alcanzar diferencias significativas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar controles versus pacientes en cada tiempo de estimulación dentro y fuera de la sinapsis.



**Figura 13. Expresión de ZAP-70 en linfocitos T estimulados o no con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, en un control sano y un paciente con LES, por microscopía confocal.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Imágenes representativas de la expresión de ZAP-70 (azul) en LT de un control sano y un paciente con LES. Las imágenes son producto de un barrido secuencial con los láseres de excitación pertinentes. Se utilizó el láser Helio-Neón de 635 nm y el canal de detección se ubicó entre 688 - 755 nm. **B.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM para ZAP-70 obtenida con el programa Image J al analizar un mínimo de 50 células por condición. El círculo punteado indica una perla representativa en la imagen.

**A****B**

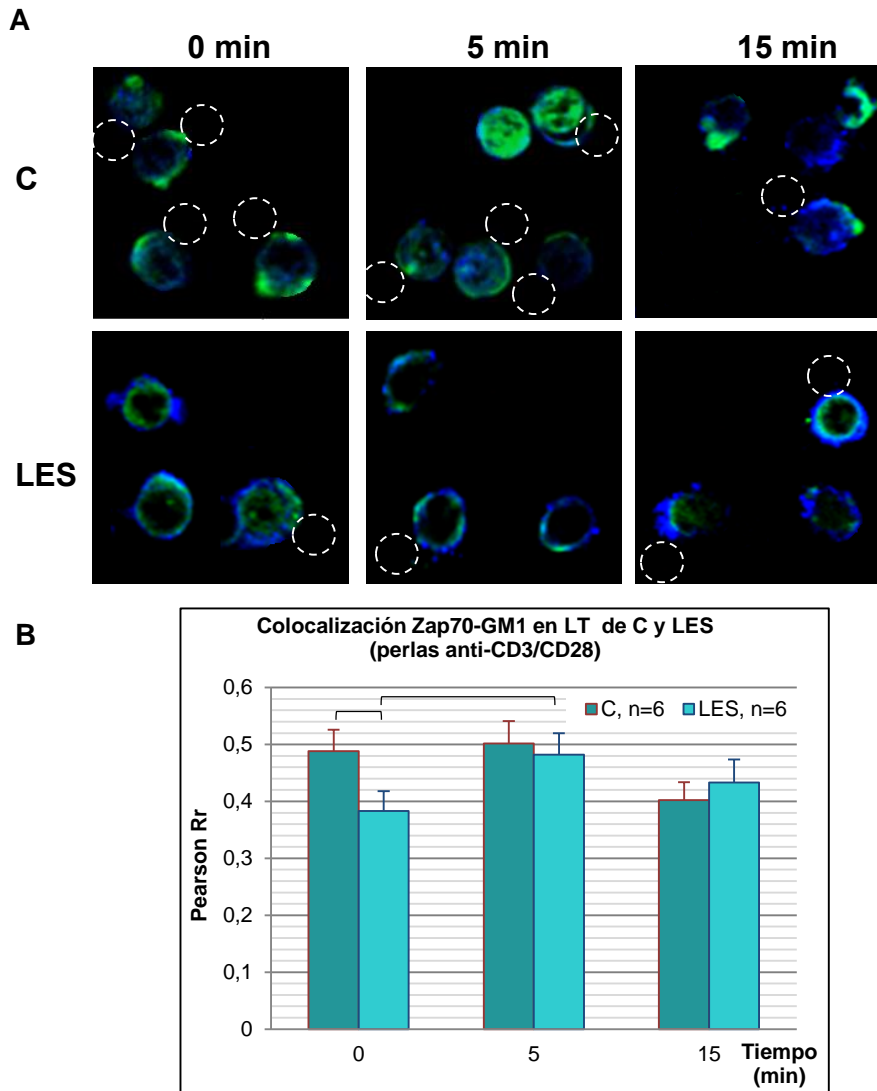
**Figura 14. Expresión de ZAP-70 dentro y fuera de la sinapsis inmunitaria en linfocitos T estimulados o no con perlas anti-CD3/anti-CD28, de controles sanos y pacientes con LES.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM dentro de la sinapsis para ZAP-70. **B.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM fuera de la sinapsis para ZAP-70. Un mínimo de 50 células por condición fue analizado utilizando el programa Image J.

**Localización de ZAP-70 en las balsas lipídicas de linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.**

En la figura 15A, se muestran imágenes representativas de la colocalización entre ZAP-70 y GM1, en LT de un control sano y un paciente con LES, en las que se puede apreciar una coloración verde-azulado indicando el comarcaje de ambas moléculas y regiones donde solo hay ZAP-70 (azul) o GM1 (verde). En línea general, el comarcaje pareciera ser similar en ambos grupos y no parece variar con la estimulación.

En la figura 15B, se muestra la gráfica de la colocalización entre ZAP-70 y GM1 en LT de 6 controles sanos y 6 pacientes con LES, medida como el coeficiente de correlación de Pearson Rr, donde mientras más cercano 1 indica mayor colocalización y mientras más cercano a 0 indica que las moléculas se encuentran en espacios físicos diferentes. En línea general, el valor del coeficiente de correlación de Pearson Rr es cercano a 0,5, es decir que una mitad de las moléculas colocaliza con el GM1, localizándose dentro de las balsas, y la otra mitad se encuentra fuera de las balsas lipídicas.

En los controles sanos, se observa una colocalización similar entre LT no estimulados y estimulados durante 5 minutos, vía TCR/CD3-CD28, la cual tiende a disminuir al estimular durante 15 minutos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en esta cinética (Fig. 15B). Por el contrario, en LT de pacientes con LES, en células no estimuladas hay un menor nivel basal de moléculas colocalizando que en controles sanos, encontrando una diferencia estadísticamente significativa (*t Student*,  $p=0,046$ ). Al estimular durante 5 minutos, incrementa significativamente la localización de ZAP-70 en la balsa (*t Student*,  $p=0,011$ ), y ésta se mantiene al mismo nivel al estimular durante 15 minutos. Al aplicar ANOVA de una vía, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la colocalización entre ZAP-70 y GM1 en LT de pacientes con LES al comparar la cinética entre células no estimuladas y estimuladas durante 5 y 15 minutos.



**Figura 15. Colocalización entre ZAP-70 y GM1 en linfocitos T estimulados o no con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES por microscopía confocal.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Imágenes representativas de la colocalización entre ZAP-70 (azul) y GM1 (verde) en LT de un control sano y un paciente con LES. Las imágenes son producto de un barrido secuencial con los láseres de excitación pertinentes y la posterior superposición de las imágenes. **B.** Gráfica del promedio del coeficiente de correlación de Pearson Rr ± ESM para ZAP-70 y GM1 obtenida con el programa Image J. Se utilizó el test *t* de Student de dos colas pareado y con diferente varianza,  $p < 0,05$ . Además, se utilizó la prueba ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ . El círculo punteado indica una perla representativa en la imagen.

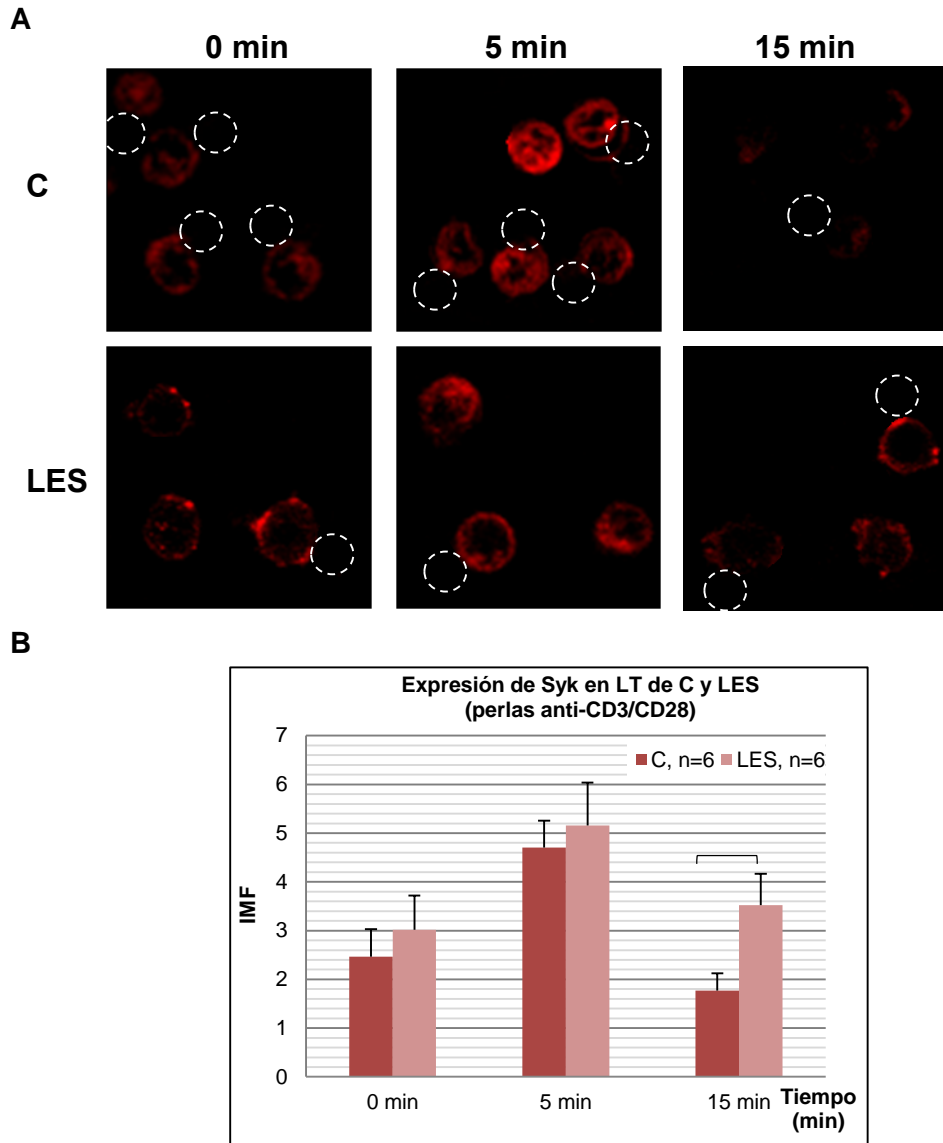
***Expresión de Syk en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.***

En la figura 16A, se muestra un experimento representativo donde se observa la fluorescencia resultante del marcaje de LT con el AcM anti-Syk y el anticuerpo secundario GAM-Cy3 (fluorescencia roja), de un control sano y un paciente con LES. Syk parece localizarse en forma de un anillo en la periferia de las células y parece abarcar una porción citoplasmática adosada o cercana a la membrana, agrupándose en polos en algunas células del control y del paciente. En el panel superior se muestra la expresión de Syk en LT del control sano, donde ésta parece incrementar a los 5 minutos de la estimulación y caer drásticamente a los 15 minutos. En los LT del paciente, Syk parece incrementar a los 5 minutos, al igual que en el control, y disminuir a los 15 minutos pero en una proporción menor a la del control.

En la figura 16B, se muestra una gráfica del promedio de la IMF para Syk en 6 experimentos con LT de controles sanos y 6 experimentos con LT de pacientes con LES. Al igual que en la figura 16A, se puede observar que en LT de controles y pacientes hay una tendencia al incremento de Syk a los 5 minutos de estimulación vía TCR/CD3-CD28, la cual disminuye a los 15 minutos, siendo más marcada en los controles que en los pacientes. Las cinéticas de expresión de Syk no mostraron diferencias estadísticamente significativas en controles sanos ni en pacientes con LES. Sin embargo, a los 15 minutos de estimulación se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa al comparar la expresión de Syk en LT de los controles sanos versus los pacientes con LES (*t Student*,  $p=0,021$ ).

En las figuras 17A y B, se muestran las gráficas del promedio de la IMF para Syk dentro y fuera de la sinapsis inmunitaria en 6 experimentos con LT de controles sanos y 6 experimentos con LT de pacientes con LES. Al igual que en la figura 16B, se puede observar que tanto dentro como fuera de la célula, en LT de controles y pacientes hay una tendencia al incremento de Syk a los 5 minutos de estimulación vía TCR/CD3-CD28, la cual

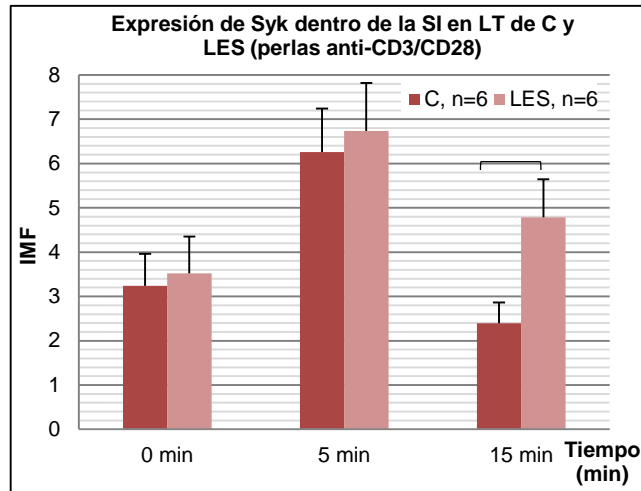
disminuye a los 15 minutos, siendo más marcada en los controles que en los pacientes, encontrando diferencias estadísticamente significativas a los 15 minutos de estimulación en ambas regiones al comparar la expresión de Syk en LT de los controles sanos versus los pacientes con LES (dentro de la sinapsis *t Student*,  $p=0,018$ ; fuera de la sinapsis *t Student*,  $p=0,014$ ).



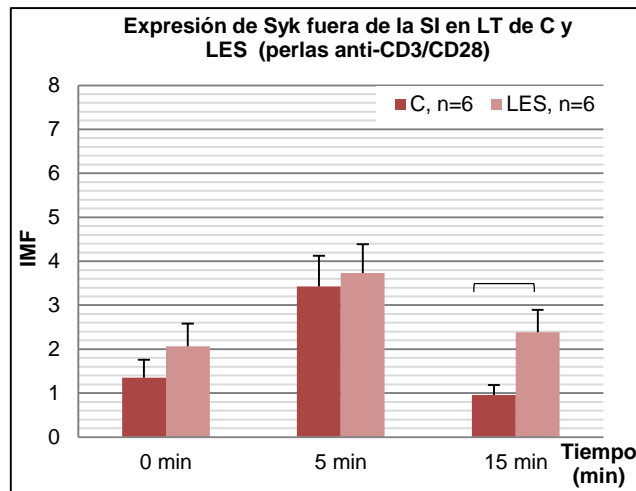
**Figura 16. Expresión de Syk en linfocitos T estimulados o no con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, en un control sano y un paciente con LES, por microscopía confocal.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Imágenes representativas de la expresión de Syk (rojo) en LT de un control sano y un paciente con LES. Las imágenes son producto de un barrido secuencial con los láseres de excitación pertinentes. Se utilizó el láser Helio-Neón de 559 nm y el canal de detección se ubicó entre 567 - 622 nm. **B.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM para Syk obtenida con el programa Image J al analizar un mínimo de 50 células por condición. El círculo punteado indica una perla representativa en la imagen.



**A**



**B**



**Figura 17. Expresión de Syk dentro y fuera de la sinapsis inmunitaria en linfocitos T estimulados o no con perlas anti-CD3/anti-CD28, de controles sanos y pacientes con LES.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM dentro de la sinapsis para Syk. **B.** Gráfica del promedio de la IMF ± ESM fuera de la sinapsis para Syk. Un mínimo de 50 células por condición fue analizado utilizando el programa Image J.

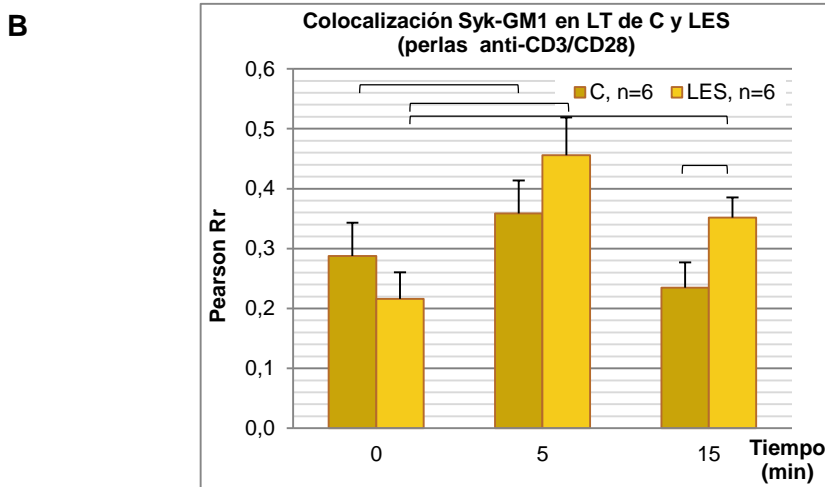
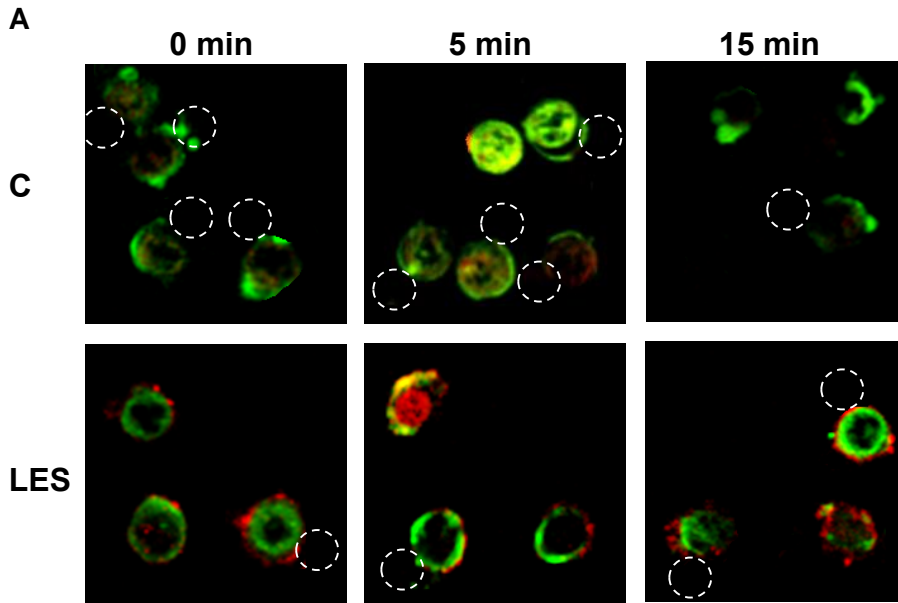
**Localización de Syk en las balsas lipídicas de linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.**

En la figura 18A, se muestran imágenes representativas de la colocalización entre Syk y GM1, en LT de un control sano y un paciente con LES, en las que se puede apreciar una coloración amarilla en algunas regiones puntuales indicando el comarcaje de ambas moléculas, y regiones donde solo hay Syk (rojo) o GM1 (verde). En el panel superior, en LT del control sano se puede apreciar un incremento en la colocalización al estimular durante 5 minutos, el cual cae drásticamente al estimular durante 15 minutos. En el paciente con LES se aprecia la misma tendencia observada en el control, solo que a los 15 minutos la colocalización disminuye en menor proporción. Al observar las imágenes del control y el paciente con LES al estimular a los 15 minutos se puede visualizar una marcada diferencia en cuanto a la colocalización de las moléculas.

En la figura 18B, se muestra la gráfica de la colocalización entre Syk y GM1 en LT de 6 controles sanos y 6 pacientes con LES, medida como el coeficiente de correlación de Pearson Rr. En línea general, el valor del coeficiente de correlación de Pearson Rr oscila alrededor de 0,2 y 0,5, es decir que entre el 20 al 50% de las moléculas de Syk se localizan en las balsas en un momento dado.

En los LT de controles sanos y pacientes con LES, se observa un aumento estadísticamente significativo al estimular durante 5 minutos en comparación con la colocalización en células no estimuladas (controles *t Student*,  $p=0,002$ ; pacientes *t Student*,  $p=0,005$ ). Posteriormente, a los 15 minutos de estimulación vía TCR/CD3-CD28, la colocalización en controles y pacientes disminuyó alcanzando un nivel similar al basal en controles, siendo menos marcado en pacientes, por lo que se encontró una diferencia estadísticamente significativa solamente en pacientes al comparar con el nivel basal de colocalización (*t Student*,  $p=0,036$ ). Estas diferencias a los 15 minutos entre controles y

pacientes arroja una diferencia estadísticamente significativa (*t Student*,  $p=0,034$ ). Al aplicar ANOVA de una vía, solo se encontró diferencias estadísticamente significativas para la colocalización entre Syk y GM1 en LT de pacientes con LES al comparar la cinética entre células no estimuladas y estimuladas durante 5 y 15 minutos ( $p=0,036$ ).



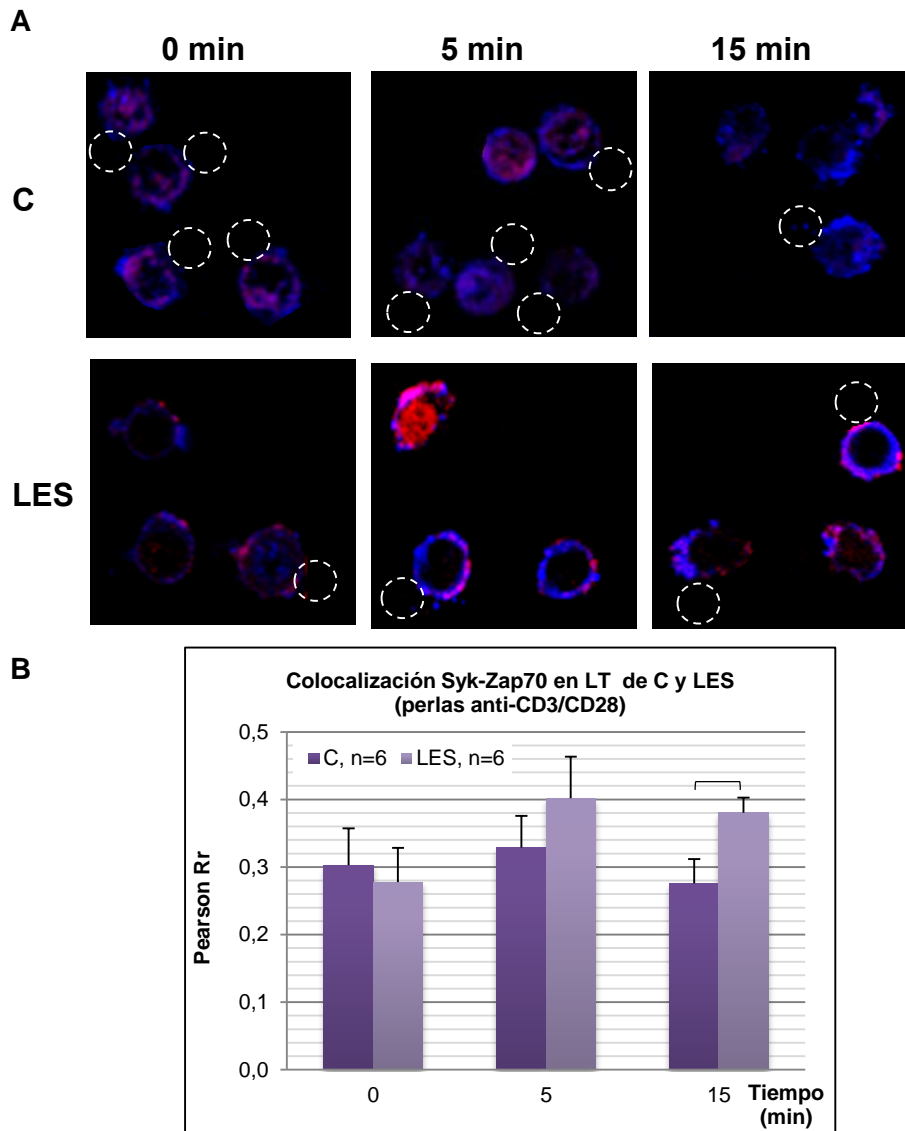
**Figura 18. Colocalización entre Syk y GM1 en linfocitos T estimulados o no con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES por microscopía confocal.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Imágenes representativas de la colocalización entre Syk (rojo) y GM1 (verde) en LT de un control sano y un paciente con LES. Las imágenes son producto de un barrido secuencial con los láseres de excitación pertinentes y la posterior superposición de las imágenes. **B.** Gráfica del promedio del coeficiente de correlación de Pearson Rr ± ESM para Syk y GM1 obtenida con el programa Image J. Se utilizó el test *t* de Student de dos colas pareado y con diferente varianza,  $p < 0,05$ . El círculo punteado indica una perla representativa en la imagen.

**Colocalización entre Syk y ZAP-70 en linfocitos T estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por microscopía confocal.**

En la figura 19A, se muestran imágenes representativas de la colocalización entre Syk y ZAP-70, en LT de un control sano y un paciente con LES, en las que se puede apreciar una coloración púrpura en algunas regiones puntuales indicando el comarraje de ambas moléculas, y regiones donde solo hay Syk (rojo) o ZAP-70 (azul). En el panel superior, en LT del control sano se puede apreciar una colocalización similar en cada punto de estimulación siendo ligeramente menor a los 15 minutos. En el paciente con LES, la colocación parece incrementar a los 5 minutos y mantenerse a los 15 minutos. Al observar las imágenes del control y el paciente con LES al estimular a los 15 minutos se puede visualizar una marcada diferencia en cuanto a la colocalización de las moléculas.

En la figura 19B, se muestra la gráfica de la colocalización entre Syk y ZAP-70 en LT de 6 controles sanos y 6 pacientes con LES, medida como el coeficiente de correlación de Pearson Rr. En línea general, el valor del coeficiente de correlación de Pearson Rr oscila entre 0,2 y 0,5, es decir que entre el 20 al 50% de las moléculas de Syk colocalizan con ZAP-70 en un momento dado.

En los LT de controles sanos se observa una colocalización similar en cada uno de los tiempos de estimulación, siendo ligeramente menor al nivel basal a los 15 minutos de estimulación. Esta tendencia no fue estadísticamente significativa. En los LT del paciente, se observa una tendencia al incremento al estimular durante 5 minutos, manteniendo un nivel similar al estimular durante 15 minutos vía TCR/CD3-CD28, lo cual no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, a los 15 minutos se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar la colocalización de Syk y ZAP-70 en controles versus pacientes (*t Student*,  $p=0,018$ ).



**Figura 19. Colocalización entre Syk y ZAP-70 en linfocitos T estimulados o no con perlas conjugadas a anti-CD3/CD28, de controles sanos y pacientes con LES por microscopía confocal.**  $7,5 \times 10^4$  LT fueron incubados en una proporción 1:2 con perlas de poliestireno conjugadas con anti-CD3/CD28, en láminas multipozo pretratadas con poli-L-lisina y estimuladas en una incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 0, 5 y 15 minutos. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anti-ZAP-70 (15 µg/mL) con GAR-A647 (20 µg/mL), anti-Syk (50 µg/mL) con GAM-Cy3 (25 µg/mL) y CTB-A488 (10 µg/mL). **A.** Imágenes representativas de la colocalización entre Syk (rojo) y ZAP-70 (azul) en LT de un control sano y un paciente con LES. Las imágenes son producto de un barrido secuencial con los láseres de excitación pertinentes y la posterior superposición de las imágenes. **B.** Gráfica del promedio del coeficiente de correlación de Pearson Rr ± ESM para Syk y ZAP-70 obtenida con el programa Image J. Se utilizó el test *t* de Student de dos colas con diferente varianza,  $p < 0,05$ . El círculo punteado indica una perla representativa en la imagen. El círculo punteado indica una perla representativa en la imagen.

## DISCUSIÓN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria que se manifiesta predominantemente en el género femenino. Su etiología es desconocida y está caracterizada por la producción de altos niveles de autoanticuerpos contra un grupo muy diverso de autoantígenos producto de la ruptura de la tolerancia inmunitaria a antígenos propios (Morrow y col., 1999), conllevando al daño de tejidos, múltiples órganos como riñón y corazón; y sistemas (nervioso y hematopoyético), producto de la interacción entre aberraciones del sistema inmunológico, factores hereditarios, hormonales y ambientales (Crispín y col., 2010).

Desde los años 90 se ha descrito que en pacientes con LES existen anomalías en la respuesta inmunitaria a autoantígenos y numerosas evidencias sugieren que defectos en vías de señalización mediadas por el receptor de antígeno de linfocitos T (TCR/CD3) pueden contribuir con la ruptura de la tolerancia inmunitaria en pacientes con lupus, siendo los linfocitos T determinantes en el mantenimiento de la tolerancia periférica a antígenos propios (Dayal y Kamer, 1996; Tsokos y Liossis, 1999; Blasini y Rodríguez, 2004); así como, su cooperación con las células B para la proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos contra antígenos timo-dependientes; inducción de la proliferación de otros LT a través de la liberación de citoquinas como IL-2; activación de macrófagos y células NK a través de la liberación de diversas citoquinas; IFN- $\gamma$  e IL-2; inducción de la actividad citotóxica de células NK y LT citotóxicos; y actividad reguladora sobre células B, monocitos, macrófagos, fibroblastos, entre otros. Es por ello que el tema de la señalización intracelular que ocurre en los LT ha sido tan ampliamente estudiado.

Considerando que los LT ejercen un papel crucial en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, y que son el foco de estudio de nuestra investigación, a continuación

procederemos a describir algunos eventos de señalización cruciales que ocurren en estos linfocitos.

La activación de las células T vírgenes es uno de los pasos más importantes en el desarrollo de una respuesta inmunológica efectiva frente a antígenos proteicos, y por tanto, requiere además del complejo TCR/MHC, correceptores y moléculas accesorias en la superficie de la célula T con sus correspondientes ligandos en la célula presentadora de antígenos (CPA) (Broere y col., 2011), cuyo ligado desencadena el agrupamiento de otras moléculas del TCR a la superficie celular, junto con otros componentes de señalización cascada abajo. Las moléculas CD3, las cuales incluyen varias proteínas transmembrana, son parte de este complejo de señalización. Éstas poseen dominios intracitoplasmáticos que contienen motivos de activación basados en tirosina (ITAMs) (Samelson y col., 1986; Letourneur y Klausner, 1992). El entrecruzamiento del TCR dispara la fosforilación de los motivos ITAMs por diversas proteínas tirosina quinasa (PTKs) de la familia *Src*, *Lck* y *Fyn* (Chu y col., 1998), los cuales constituyen puntos de anclaje o asociación para ZAP-70, una quinasa de la familia *Syk*, que es reclutada mediante sus dominios SH2 a los ITAMs fosforilados, y ésta a su vez fosforila a un conjunto de moléculas cascada abajo, entre ellas, *Cbl*, *SLP-76*, *Vav*, *PLCγ1* y *LAT* (Chu y col., 1998). Estos eventos de transducción de señales traen como consecuencia, la activación del complejo  $Ca^{2+}$ /calcineurina y vías de señalización mediadas por *Ras*, y finalmente la activación y translocación de factores de transcripción al núcleo dando lugar a la transcripción de genes que participan en procesos de proliferación, diferenciación, activación y/o maduración de células T o apoptosis (Mindy y col., 2008).

Existen múltiples evidencias que demuestran que la transducción de señales a través del TCR se encuentra alterada en LT de pacientes con LES, entre ellos, se ha descrito una regulación defectuosa de quinasas clave que intervienen en las primeras etapas



de activación del TCR (Blasini y Rodriguez, 2004), donde particularmente nuestro equipo de investigación y otros investigadores han demostrado un patrón anormal de proteínas fosforiladas en tirosina (Blasini y col., 1998; Liossis y col., 1998; Matache y col., 1996), además de un aumento en la actividad quinasa de Fyn que no fue observado para otras PTKs como Lck y ZAP-70, y una menor expresión de Fyn y Lck; así como una expresión disminuida de la cadena  $\zeta$  (Brundula y col., 1999); aumento en la polimerización de actina y flujo anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Krishnan y col., 2008; Vassilopoulos y col., 1995); hiperpolarización mitocondrial que subyacen procesos de apoptosis incrementada y sobreexposición a antígenos propios (Perl y col., 2004). Por el contrario, no se observaron diferencias al estudiar la actividad fosfatasa de CD45 en linfocitos T no estimulados y estimulados vía TCR/CD3 (Blasini y col., 1998).

En este sentido, dado los defectos mencionados en la expresión de la cadena  $\zeta$  en linfocitos T de pacientes con LES (Brundula y col., 1999), Krishnan y col., reportaron que en estos pacientes ocurre un “recableado” de la señalización vía TCR/CD3 donde la cadena  $\zeta$  del complejo CD3 es sustituida por el receptor Fc $\gamma$  (FcR $\gamma$ ) que se asocia con CD3 $\epsilon$ , y por ende ZAP-70 es a su vez sustituida por la PTK de la familia Syk citoplasmática del bazo de 72 kDa (Syk) (Krishnan y col., 2008; Kyttaris, 2010). FcR $\gamma$  es homólogo en forma y función a la cadena  $\zeta$  del CD3, aunque esta última tiene tres dominios ITAMs mientras que FcR $\gamma$  sólo tiene uno (Crispín y col., 2008; Grammatikos y Tsokos, 2012). La señalización a través de este “recableado del TCR” se presume que es más fuerte debido a este dueto alternativo FcR $\gamma$ /Syk, que es enzimáticamente 100 veces más potente que la vía canónica CD3 $\zeta$ /ZAP-70 (Oliver y col., 1944; Krishnan y col., 2003). Una consecuencia directa de este reensamblaje del TCR, podría ser la regulación defectuosa de quinasas clave que intervienen en las primeras etapas de activación del TCR (Blasini y Rodriguez, 2004). Krishnan y col. encontraron que la transfección de la cadena FcR $\gamma$  dentro de los LT amplifica

eventos de señalización del TCR en una manera Syk quinasa dependiente y puede así imitar la señalización anormal de LT de pacientes con LES (Krishnan S. y col., 2004).

Sobre la base de los hallazgos antes descritos, en este proyecto de investigación nos hemos dedicado a estudiar algunos aspectos relacionados con las PTKs ZAP-70 y Syk.

Como mencionamos anteriormente, ZAP-70 es una proteína tirosina quinasa citoplasmática que pertenece a la familia Syk y se expresa en células T y en células NK. Esta proteína juega un papel crítico en los eventos involucrados en el inicio de la respuesta de los LT mediante el TCR (Wang y col., 2010).

Syk es una proteína tirosina quinasa citoplasmática perteneciente a la familia Syk, que se encuentra expresada en células B, mastocitos, neutrófilos, macrófagos y plaquetas, siendo importante en la transducción de señales iniciadas por inmunoreceptores, tales como el receptor de células B (BCR), receptores Fc y receptores de células NK (Pamuk y Tsokos, 2010). Particularmente, el ligado del BCR inicia la fosforilación de los motivos ITAMs por parte de las PTKs de la familia Src, Lyn, Fyn, Blk y Lck, (Taniguchi y col., 1991), donde la PTK Syk es reclutada posteriormente mediante sus dominios SH2 a los ITAMs fosforilados, conllevando así a su activación. Además, Syk es necesaria para la fosforilación de múltiples proteínas, entre ellas a SLP-65 o BLNK, BTK, PLC $\gamma$ 2, Vav y Cbl, que regulan importantes rutas tales como flujo de Ca $^{2+}$  y la activación de la cascada de las MAPKs (Fu y col., 1998; Chiu y col., 2002; Koretzky y col., 2006; Groesch y col., 2006). Takata y col., (1994), demostraron que la deficiencia de Syk suprime la fosforilación de PLC $\gamma$ 2, resultando en la pérdida de la generación de IP3, y en consecuencia, la movilización de Ca $^{2+}$  bajo la estimulación del receptor. Por su parte, Chen y col., (1995) demostraron que la mutación de Syk bloquea la diferenciación de LB por la interrupción de la señalización a través del complejo pre-BCR y de este modo, impide la expansión clonal, y la maduración de células

pre-B; indicándonos que esta proteína es esencial para la diferenciación y maduración de LB.

La estructura de ZAP-70 y Syk se encuentra altamente conservada; desde el amino terminal al extremo carboxilo poseen: 1, dos dominios SH2 que comparten 57% de similitudes en su secuencia tandem, los cuales se unen a dominios ITAMs fosforilados; 2, una región adaptadora de 80 a 110 aminoácidos, postulado por unir y reclutar efectores celulares; 3, un dominio catalítico, incluyendo sitios de unión de ATP y fosforilación de tirosina; y 4, una extensión carboxilo terminal que posee una función aún no determinada (Latour y col., 1997).

Evidencias genéticas han confirmado que quinasas de la familia *Syk* son esenciales para la señalización del TCR en linfocitos T maduros. Particularmente, se ha descrito que la inmunodeficiencia combinada severa (SCID del inglés *severe combined immunodeficiency*) es causada por la ausencia de la proteína ZAP-70. Esta disminución viene dada por la pérdida transcripcional del marco de lectura o varias mutaciones por inserción que resulta en una proteína desestabilizada (Elder y col., 1994).

Actualmente, el papel más reconocida de Syk es su importancia como promotor de la supervivencia celular en numerosos tipos de células cancerígenas que van desde leucemia a retinoblastoma que han despertado considerable interés en esta proteína como diana para la generación de nuevos medicamentos contra el cáncer (Geahlen, 2014). De hecho, se ha postulado que esta molécula es un eficaz modulador del crecimiento de células epiteliales y un supresor potencial de tumores en carcinomas de seno humano (Coopman y col., 2000).

Además, funciones anómalas de Syk han sido asociadas con enfermedades autoinmunitarias y alérgicas (Pamuk y Tsokos, 2010). Fleischer y col., (2014) consiguieron que los LB de memoria de pacientes con LES tienen una mayor expresión de Syk en comparación con LB vírgenes. Por su parte, como se mencionó anteriormente, la activación

óptima de Syk, requiere la activación previa de diversas PTKs, particularmente, Flores-Borja y col., (2005) reportaron que una de estas PTKs, Lyn tiene una expresión disminuida en LB de pacientes con LES debido a una mayor ubiquitinación de esta proteína, y una menor translocación de ésta a regiones conocidas como balsas lipídicas (comentadas más adelante). Dicha alteración de Lyn conlleva a una producción incrementada de autoanticuerpos anti-ADNdc y aumento en la producción de IL-10.

Por estos motivos, estudios preclínicos apuntan a que la inhibición de Syk puede ser de importancia terapéutica en el tratamiento de artritis reumatoide, y otras formas de artritis, así como LES, citopenias autoinmunes, injuria de órganos asociada a trasplante y procedimientos de revascularización. De hecho, se han desarrollado diferentes inhibidores de Syk, por ejemplo, R788 (fostamatinib), que se encuentra en fase 2 para artritis reumatoide, el cual parece inhibir la actividad de la enfermedad, sin embargo, genera efectos adversos como hipertensión y neutropenia (Weinblatt y col., 2010). Adicionalmente, el tratamiento con R788 en ratones propensos al lupus MRL/lpr y BAX/BAK no sólo previenen el desarrollo de patologías renales y de piel sino que sirve como tratamiento de la enfermedad (Deng y col., 2010); igualmente, la administración a largo plazo (24-34 semanas) de R788 en ratones NZB/NZW antes y después de la aparición de los síntomas resultó en un retraso en la disfunción renal y proteinuria, disminución de la infiltración renal y supervivencia prolongada (Bahjat y col., 2008). Además, R112 otro potente inhibidor de Syk formulado para uso intranasal, causa una rápida mejoría de la inflamación de las vías respiratorias e inhibe en poco tiempo la activación de mastocitos (Metzel y col., 2005).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que en linfocitos T no estimulados de pacientes con LES ocurre un acoplamiento anormal a Grb2 de proteínas fosforiladas en tirosina, como c-Cbl encargado de ubiquitinar diversas proteínas para su degradación proteasomal, y una disminución en la unión de Sos a Grb2 en células T sin

estimular y estimuladas de pacientes con LES al comparar con controles sanos y controles inflamatorios de la enfermedad (Cedeño y col., 2003; Cifarrelli, 2003). El acoplamiento de Sos a Grb2 es importante para la formación del complejo ZAP-70/Grb2/Sos que es reclutado hacia la membrana por interacción con LAT una vez que ésta es fosforilada en tirosina por ZAP-70. Sos es indispensable para la activación de Ras y el disparo de la cascada Ras/Raf/ERK. Por otra parte, se observó una disminución en la expresión y una localización disminuida de LAT dentro de las balsas lipídicas y en la sinapsis inmunológica de células T activadas vía TCR/CD3 de pacientes con lupus (Abdoel y col., 2012).

Considerando que el bloqueo de la activación de p21<sup>ras</sup> en células T CD4<sup>+</sup> conlleva a un estado de anergia en estas células (Fields y col., 1996; Li Wei y col., 1996) y que los linfocitos T autorreactivos de pacientes con LES escapan de la tolerancia periférica al no mantenerse anérgicos ante la estimulación con autoantígenos, en nuestro laboratorio se decidió investigar la actividad de las MAPKs ERK1/ERK2 como medida distal del grado de activación de p21<sup>ras</sup> (Cifarrelli, 1999, Cedeño y col, 2003). Se encontró que estas proteínas tienen una actividad quinasa disminuida en pacientes con LES al coestimular los linfocitos T por la vía TCR/CD3 y la PKC. Sin embargo, la estimulación única de la PKC, indujo niveles de doble fosforilación de las MAPKs ERK1/ERK2 similares entre controles sanos y pacientes con LES. Esto sugiere que la capacidad intrínseca de las MAPK de ser doblemente fosforiladas como también su actividad quinasa no se encuentra alterada en los linfocitos T de los pacientes y que algunas alteraciones ya descritas y/o aún desconocidas, en eventos tempranos de la señalización vía TCR/CD3, podrían estar generando una activación defectuosa de ERK1 y ERK2.

En resumen, en nuestro laboratorio se reportó una actividad quinasa disminuida de ERK1/ERK2 en LT de pacientes con LES (Cedeño y col., 2003). Previamente, nuestro grupo de investigación había reportado una expresión disminuida de la cadena  $\zeta$  del complejo CD3

del TCR y un patrón alterado de moléculas fosforiladas en tirosina (Brundula y col., 1999). Estos hallazgos condujeron a la observación de que existía un acoplamiento anormal del complejo Grb2/Sos (Cedeño y col., 2003; Cifarelli, 2003), y posteriormente a que había una disminución en la localización de LAT en las balsas lipídicas lo que pudiera afectar la formación del signalosoma (Abdoel y col., 2012), crucial para la transducción de señales hacia las MAPKs, señales éstas que determinan el destino de la célula (proliferación, diferenciación, apoptosis). Otros investigadores reportaron que la cadena  $\zeta$  del complejo CD3 asociada a ZAP-70 es sustituida por el FcR $\gamma$  asociado a Syk (Enyedi y col., 2001). Conforme con estos hallazgos, nos hemos planteado que posibles alteraciones en la expresión y/o translocación de ZAP-70 y/o Syk a las balsas lipídicas pudieran contribuir con el estado de hiperestimulación observado en LT de pacientes con LES promoviendo así la ruptura de la tolerancia periférica a autoantígenos.

Para el estudio de los LT de controles sanos y pacientes con LES, aislamos estas células a partir de sangre venosa heparinizada utilizando gradientes de Ficoll y el kit comercial RossetteSep™, una mezcla de anticuerpos que permite purificar LT por selección negativa junto con eritrocitos autólogos. Mediante la técnica de citometría de flujo determinamos la pureza de nuestra población de LT, la cual fue de 83 %, ajustándose al valor esperado descrito en el inserto del kit (80-95%).

Con el fin de estudiar la expresión de Syk y ZAP-70 mediante la técnica de Western blot en LT de controles sanos y pacientes con LES, nos dimos a la tarea de estandarizar el número de LT tal que pudiésemos observar una buena señal para ambas moléculas. Establecimos que con lisados de  $5 \times 10^6$  de LT observábamos señal de ambas proteínas por esta técnica. LT de controles sanos y pacientes con LES fueron estimulados vía TCR/CD3-CD28 durante 5 y 15 minutos en placas de poliestireno.

Como se mencionó anteriormente, la interacción del LT con la CPA, promueve la activación de Lck fosforilando los motivos ITAMs de las cadenas intracitoplasmáticas del complejo CD3. Una vez que han sido doblemente fosforiladas, éstas promueven el reclutamiento de ZAP-70 mediante sus dominios SH2, dando lugar a su activación por fosforilación del residuo tirosina, el cual está localizado en el lazo de activación del dominio catalítico (Chan y col., 1995), resultando, de esta manera, en la fosforilación/activación de otras proteínas y el reclutamiento de adaptadores, los cuales orquestan la cascada de señalización cascada abajo (Wang y col., 2010).

Al evaluar la expresión de ZAP-70 en lisados totales de LT estimulados vía TCR/CD3-CD28, mediante ensayos de Western blot, observamos que en controles sanos hubo una tendencia al incremento en la expresión de ZAP-70 al estimular durante 5 minutos, indicando que posiblemente nuevas moléculas de ZAP-70 son sintetizadas producto de la estimulación (Wang y col., 2010). Posteriormente, su expresión cae ligeramente a los 15 minutos, quedando por encima del nivel basal. A pesar de que dichas tendencias no fueron estadísticamente significativas, este hecho apunta a que pudiese estar ocurriendo un recambio de ZAP-70 al estimular las células de los controles sanos durante tiempos más prolongados. Por otra parte, en pacientes con LES la expresión de esta proteína fue similar en cada uno de los tiempos de estimulación evaluados, posiblemente producto del recableado del TCR/CD3 donde la célula no requiere de más moléculas de ZAP-70 para cumplir la fosforilación de moléculas cascada abajo puesto que esta función está más relacionada con el dueto FcRγ-Syk que con CD3ζ-ZAP-70 (Enyedy y col., 2001; Krishnan y col., 2003; Nambiar y col., 2003). Estos potenciales hallazgos deben ser confirmados aumentando el número de experimentos con la finalidad de observar si estas diferentes respuestas muestran significancia estadística.

La siguiente molécula cuya expresión fue evaluada por la técnica de Western blot fue Syk. ZAP-70 y Syk, son las únicas dos PTKs pertenecientes a la familia Syk que han superpuesto y ejercen distintas funciones en la señalización intracelular a través de inmunoreceptores como el BCR y el FcRγ (Wang y col., 2010). La activación del receptor, promueve la fosforilación de los ITAMs por varias PTKs, y en consecuencia, el posterior reclutamiento y activación de Syk a través de interacciones mediante sus dominios SH2 que disparan a su vez, la activación de quinasas y de señales cascada abajo (Pamuk y Tsokos, 2010).

Uno de los hallazgos más relevantes encontrados en nuestra investigación involucra la expresión de Syk en LT estimulados vía TCR/CD3-CD28, donde logramos observar que al estimular durante 5 minutos se produjo un aumento significativo en la expresión de Syk en LT de pacientes con LES y controles sanos, la cual se mantiene al comparar con el nivel basal de expresión de esta proteína. A este respecto, cabe señalar que este resultado concuerda con la expresión similar de ZAP-70 por Western blot en pacientes con LES antes descrita y con los hallazgos reportados por Krishnan y col. (2003), entre otros (Enyedy y col., 2001; Nambiar y col., 2003) referente a la mayor expresión de la dupla FcRγ/Syk vs CD3ζ/ZAP-70.

Debemos resaltar que no esperábamos encontrar niveles significativos de Syk en LT de controles sanos puesto que, según la literatura, su expresión es mucho más marcada en LB (Takata y col., 1994; Kurosaki y col., 1994). Además, Krishnan y col., (2008) muestran que en LT de controles sanos la expresión de Syk es relativamente baja con respecto a LT de pacientes con LES. No obstante, Chan y col., (1994) reportaron, hace más de una década, que Syk y ZAP-70 desempeñan diferentes funciones en subtipos de células T dada la flexibilidad de la señalización a través del TCR en diferentes contextos inmunológicos, donde se ha observado que puede ocurrir un simple “switch” o intercambio entre la



utilización de Syk o ZAP-70 por el TCR (Chan y col., 1994). Por ejemplo, en el timo Syk muestra una alta expresión en timocitos y posteriormente sufre una regulación negativa en respuesta a señales inducidas por el pre-TCR, mientras que ZAP-70 aparece más tarde durante la transición de CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, una etapa en que la señalización a través de la cadena  $\zeta$  del TCR es requerida (Chan y col., 1994). En la periferia, los LT vírgenes y LT de memoria en ratones y humanos expresan grandes cantidades de ZAP-70 y bajas cantidades de Syk. Además, LT CD4<sup>+</sup> efectores activados *in vitro* poseen una mayor expresión de Syk y muestran una mayor asociación con el TCR a través de FcR $\gamma$  comparada con ZAP-70 (Krishnan y col., 2003).

En el mismo orden de ideas, considerando que ZAP-70, entre otras numerosas moléculas como la cadena  $\zeta$  del TCR, Lck, Fyn, el complejo LAT/Grb2/SLP-76/Sos, requieren de su ubicación y/o translocación a las balsas lipídicas para garantizar la transducción de señales cascada abajo, investigamos la localización de ZAP-70 y Syk, en estos microdominios de membrana (Jury y col., 2007).

Desde hace más de una década, se ha demostrado que la organización de moléculas que intervienen en la señalización dentro de microdominios discretos asociados a la membrana, llamados balsas lipídicas, es vital para la regulación de las vías que promueven la activación de los LT. Las balsas lipídicas fueron originalmente definidas por su solubilidad en detergentes no iónicos (específicamente Triton X-100), lo cual facilita su aislamiento ya que poseen baja densidad en gradientes de densidad de sacarosa de 5-30%, ultracentrifugados a 4 °C. Sus dominios consisten en el ensamblaje de manera espontánea de largas colas hidrofóbicas saturadas de los esfingolípidos que tienden a empaquetarse con colesterol, mientras que los fosfolípidos de membrana forman una fase más fluida por la presencia de grupos acilos insaturados (Montixi y col., 1998).

Bajo condiciones normales, el entrecruzamiento del TCR induce una rápida agrupación de las balsas lipídicas que promueve la inmediata activación de las *Src* quinasas, *Lck* y *Fyn*, y la acumulación subsiguiente de una serie de sustratos fosforilados (Kanel y col., 2000; Langlet y col., 2000; Leo y Schraven, 2001), incluyendo las moléculas  $CD3\zeta$  hiperfosforiladas (Montixi y col., 1998; Xavier y col., 1998; Kosugi y col., 1999), las formas activadas de ZAP-70 y PLC $\gamma$ 1, IP3K, el factor intercambiador Vav/Rc/CDC42 (Brdicka y col., 1998; Zhang y col., 1998), proteínas unidas a GTP, receptores unidos a GPI, CD4, CD8 y LAT; (Zhang y Samelson, 2000; Tomlinson y col., 2000; Brdicka y col., 2000); así como la PTP CD45 (Jury y col., 2004). La acción coordinada de estas interacciones y la señalización subsiguiente resulta en una estable pero dinámica zona de contacto entre la CPA y el LT conocido como sinapsis inmunológica (SI) (Bromley y col., 2001). Los dominios de las balsas lipídicas proveen un ambiente que favorece la transducción de señales del inmunoreceptor, y por tanto, la organización de moléculas de señalización dentro de estas regiones de contacto, es vital para la regulación de vías de activación de LT (Simons y Ikonen, 1997; Simons y Toomre, 2000; Janes y col; 2000).

La interrupción de las balsas lipídicas conlleva al desplazamiento anormal de moléculas de señalización (Kabouridis y col., 1997; Zhang y col., 1998; Xavier y col. 1998; Montixi y col., 1998; Kabouridis y col., 2000). Se ha demostrado que las balsas lipídicas de LT de pacientes con LES poseen una composición alterada de moléculas que interrumpen vías de señalización intracelulares y afectan la función de estas células (Kabouridis y col., 1997; Zhang y col., 1998; Xavier y col., 1998; Montixi y col., 1998; Kabouridis y col., 2005). Entre ellas tenemos, incremento en la expresión de FcR $\gamma$ , Syk, PLC $\gamma$ 1, con una disminución en la expresión de *Lck* (Jury col., 2003; Jury y col., 2004; Krishnan y col., 2004; Kabouridis y col., 2008) y una menor expresión y localización anormal de LAT una vez es estimulada vía TCR/CD3 (Abdoel y col., 2012). Los LT de pacientes con LES exhiben balsas lipídicas agrupadas, indicando que éstas células se encuentran “preparadas” para su activación. La

membrana plasmática de LT de pacientes con LES posee una mayor cantidad de GM1 y colesterol, confirmando así que estas células tienen un fenotipo hiperactivado (Jury col., 2004; Krishnan y col., 2004). Además, los LT de pacientes con LES poseen un pool más extenso y son más robustas en su capacidad para generar balsas lipídicas y presentan una dinámica acelerada del citoesqueleto, así como, una respuesta incrementada de  $Ca^{2+}$ , debido al menos en parte, a mecanismos dependientes de balsas lipídicas, en comparación con controles sanos (Krishnan y col., 2004).

Las balsas lipídicas y las moléculas contenidas en ellas pueden ser estudiadas a través de diversas técnicas como Slot blot, precipitación de moléculas con cloroformo-metanol para Western blot, microscopía electrónica y microscopía confocal. Las dos últimas permiten visualizar balsas lipídicas en células intactas y de ellas se pueden obtener imágenes analizables posteriormente que proporcionan información acerca de su rol durante la señalización.

Las técnicas antes mencionadas permiten utilizar la subunidad B de la toxina de cólera (CTB) como un marcador de las balsas lipídicas, la cual se une específicamente al gangliósido GM1 enriquecido en las balsas lipídicas (Jury y Kabouridis, 2004; Krishnan y col., 2004).

Realizamos experimentos con la técnica de microscopía confocal con el fin de evaluar nuestra población de LT estimulados mediante el uso de perlas conjugadas a anti-CD3 y anti-CD28, de controles sanos y pacientes con LES, en los que observamos la expresión del gangliósido GM1, Syk y ZAP-70, donde estandarizamos en estas dos últimas la concentración óptima de anticuerpos primarios y secundarios, así como la mejor combinación de anticuerpos con la finalidad de obtener la mejor señal fluorescente posible para cada una de las moléculas. Esta metodología destaca por la obtención de imágenes representativas del experimento evaluado, obtención de imágenes de alta resolución, una

mayor sensibilidad que el Western blot para la cuantificación de proteínas, la posibilidad de visualizar planos específicos de la célula y la reconstrucción 3D de las imágenes obtenidas. Posterior al análisis de las imágenes obtenidas, mediante el programa Image J, los resultados se muestran en términos de la IMF (intensidad media de la fluorescencia), la cual es un indicador proporcional al número de moléculas marcadas por el anticuerpo.

Como control negativo, se evaluó el marcaje de las células con los anticuerpos secundarios pertinentes. Los controles negativos permiten evaluar las inespecificidades de los anticuerpos secundarios, es decir, si hay células u otros artefactos que son reconocidos por éstos y generan fluorescencia basal y si ésta contribuye con la fluorescencia de las moléculas específicas evaluadas. Además, permite establecer el valor de las ganancias del fotomultiplicador del microscopio confocal antes de analizar el marcaje de las células con los diferentes anticuerpos y sus respectivos fluorocromos.

Como se mencionó anteriormente, al evaluar la expresión de GM1 observamos que la expresión de este gangliósido tiende a disminuir ligeramente al incrementar el tiempo de estimulación tanto en pacientes con LES como en controles sanos, sin embargo este hallazgo no fue estadísticamente significativo, ni al comparar la expresión de la molécula entre pacientes y controles. Es importante resaltar que otros investigadores han reportado diferencias en cuanto al contenido de GM1 en las balsas lipídicas de pacientes con LES y que esta alteración afecta la dinámica de las balsas posiblemente favoreciendo la activación previa de moléculas de señalización contenidas dentro de estas regiones, y en consecuencia mediar una señalización más rápida de proteínas cascada abajo (Jury col., 2004; Krishnan y col., 2004). Estas observaciones contrastan con nuestros hallazgos actuales y previos (Abdoel y col., 2012) posiblemente por diferencias en la población de pacientes estudiados por nuestro grupo (pacientes mestizos de origen venezolano) versus los pacientes estudiados por los otros investigadores.

Por otra parte, el uso de las perlas conjugadas a los anticuerpos estimulantes permite evaluar la polarización de moléculas hacia la región de contacto entre la perla y el LT, es decir que simula una sinapsis *in vitro*. Cabe resaltar que esta sinapsis simulada carece de múltiples moléculas de superficie por parte de la perla que son requeridas para la formación de una sinapsis inmunológica *in vivo*, la cual ocurre en presencia de una CPA. Como se mencionó anteriormente, la formación de la SI es el resultado del contacto sostenido entre el LT y la CPA, siendo este el sitio donde el TCR interactúa con el complejo MHC-antígeno expresado en la CPA. La SI fue inicialmente caracterizada en la membrana de los LT como dos anillos concéntricos formados por receptores de membrana, proteínas de señalización y rearrreglos del citoesqueleto que influyen e intervienen en la activación de la célula T (Alarcon y col., 2011). La polimerización de la actina, que ocurre tras el ligado del TCR, ejerce un papel importante en la señalización intracelular (Valensin y col., 2002), ya que es requerida para la formación de la SI, permite el ensamblaje y estabilización de complejos de señalización, y además, las fuerzas contráctiles que resultan del movimiento de los filamentos de actina dependientes de miosina, segregan a los TCRs unidos al MHC de la CPA a grupos de activación supramoleculares o SMAC. El anillo central se encuentra formado por el complejo TCR/CD3 constituyendo el cSMAC en el punto de contacto intercelular, donde se reúnen las proteínas de señalización Lck, Fyn y PKC $\theta$ , mientras que periférico a este grupo central se encuentran los receptores CD4, CD28 y CD45, que proveen puntos focales para la polimerización de la actina y el entrecruzamiento del TCR/CD3 (pSMAC) (Alarcon y col., 2011; Broere y col., 2011; Dustin, 2002).

Para el análisis de la expresión de GM1, Syk y ZAP-70 dentro y fuera de la sinapsis, colocamos una ventana en forma de óvalo alrededor de la región donde se polariza la molécula (dentro de la sinapsis) y otra ventana alrededor de la región restante de la célula (fuera de la sinapsis).

Volviendo a la expresión de GM1 dentro y fuera de la sinapsis, podemos decir que al igual que en la célula total, ésta no se vió afectada con la estimulación de los LT de controles sanos ni pacientes con LES.

Aprovechamos los experimentos realizados por microscopía confocal para reevaluar la expresión de ZAP-70 y Syk. Al estudiar la expresión de ZAP-70 en LT estimulados con perlas conjugadas a anti-CD3 y anti-CD28, no encontramos diferencias significativas en pacientes con LES ni en controles sanos; ni al comparar la expresión de ésta molécula dentro y fuera de la sinapsis. Si contrastamos estos hallazgos con los obtenidos por Western blot, podemos decir que hasta los momentos nuestros resultados concuerdan entre sí puesto que con ambas técnicas la expresión de ZAP-70 fue relativamente similar en controles y pacientes y que la estimulación no produjo cambios significativos en su expresión.

Una de las múltiples ventajas de la microscopía confocal es que permite evaluar la expresión simultánea de moléculas de interés en un mismo espacio físico de la célula y se pone de manifiesto bajo la mezcla de colores de los diferentes fluorocromos, los cuales pueden ser correlacionados con la prueba de Pearson.

Al evaluar la colocalización de las moléculas ZAP-70 y GM1 observamos que en LT de controles sanos no ocurrieron cambios significativos en la ubicación de ZAP-70 en la balsa al estimular vía TCR/CD3-CD28. Sorpresivamente, en pacientes con LES hubo un incremento significativo en la ubicación de esta proteína en las balsas lipídicas al estimular durante 5 minutos, descendiendo posteriormente a su nivel basal. Tal situación parece indicar que ocurre una translocación importante de ZAP-70 a la balsa durante los primeros minutos de estimulación. Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Wang y col., (2010) quienes sugieren que posterior a la estimulación ocurre un incremento en la expresión de ZAP-70, lo cual va acompañado de su función en la fosforilación de diversas

moléculas conformando el signalosoma necesario para que las señales lleguen de manera efectiva al núcleo (Gorentla y Xhong, 2012). Además, observamos que en células no estimuladas de los pacientes, hay una colocalización significativamente menor que en controles, posiblemente debido a deficiencias cuantitativas y/o funcionales de moléculas señalizadoras tempranas, entre ellas la cadena  $\zeta$  del receptor asociada a ZAP-70 (Brundula y col., 1999) y Lck (Jury y col., 2004), las cuales deben ser translocadas a la balsa en mayor proporción para que ocurra la transducción de señales cascada abajo.

Considerando el coeficiente de Pearson, podemos decir que en línea general, la mitad de las moléculas de ZAP-70 se ubica en la balsa y la otra mitad se encuentra fuera de las balsas lipídicas. Estos resultados concuerdan con evidencias que demuestran que el entrecruzamiento del TCR promueve una rápida agrupación en las balsas lipídicas de diversas moléculas, entre ellas ZAP-70 (Bdricka y col., 1998; Zhang y col., 1998).

Como se mencionó anteriormente, nos hemos centrado en evaluar la expresión de Syk en vista de la importancia del modelo propuesto por Krishnan y col., (2003), del “recableado” en la señalización de células T de pacientes con LES, donde participa el dueto alternativo FcR $\gamma$ /Syk que sustituye al dueto CD3 $\zeta$ /ZAP-70.

Nuestros resultados obtenidos mediante la técnica de microscopía confocal evaluando la expresión de Syk en LT de pacientes con LES presentan la misma cinética que observamos mediante ensayos de Western blot, donde hubo una tendencia al incremento en la expresión de Syk al estimular durante 5 minutos, la cual tiende a disminuir al estimular durante 15 minutos sin alcanzar su nivel basal, confirmando así nuestros hallazgos. Esto pudiera indicar, una vez más, que siendo Syk enzimáticamente 100 veces más potente que ZAP-70 y que ésta se encuentra unida al receptor Fc $\gamma$  en sustitución del dueto CD3 $\zeta$ /ZAP-70 (Nambiar y col., 2004), pudiera estar cumpliendo su función quinasas en los primeros minutos

de la estimulación y, por lo tanto, en fase más tardía Syk comienza a ser degradada por el proteasoma una vez ubiquitinada.

Igualmente, en LT de controles sanos, tanto por microscopía confocal como por Western blot esta molécula tiende a incrementar a los 5 minutos de estimulación lo que parece indicar que Syk es requerida por la célula en los primeros minutos de su estimulación. Como mencionó Krishnan y col., (2003), Syk tiene una expresión incrementada en LT CD4<sup>+</sup> efectoras en comparación con ZAP-70, lo que parece indicar que Syk en condiciones normales ejerce un papel importante en la transducción de señales dependiendo del contexto celular.

La microscopía confocal es una técnica mucho más sensible que el Western blot en cuanto a que detecta por fluorescencia la expresión de una molécula in vivo y dicha fluorescencia es cuantificable por el análisis de imágenes de alta resolución. Tomando esto en consideración, podemos decir que este hallazgo resaltante en nuestra investigación, en cuanto a la diferencia significativa obtenida por microscopía confocal a los 15 minutos de estimulación vía TCR/CD3-CD28, al comparar controles versus pacientes, apunta a que en controles ocurre una mayor degradación proteasomal de Syk una vez cumplida su función, mientras que en pacientes con LES ocurre un menor nivel de degradación, quizás más tardía, posiblemente debido a las múltiples deficiencias en la señalización vía TCR/CD3-CD28, donde es necesaria una mayor cantidad de Syk en la célula para ensamblar y garantizar que las señales fluyan cascada abajo, dando lugar a la eventual activación de la cascada de las MAPKs y al estado de hiperestimulación que muestran estas células. Para clarificar estos hallazgos, nos hemos propuesto realizar más experimentos por ambas técnicas para poder visualizar mejor y concluir acerca de la cinética de la expresión de Syk.

En cuanto a la expresión de Syk dentro y fuera de la sinapsis (perlas conjugadas a anti-CD3/CD28), su cinética fue idéntica al de la célula total en pacientes con LES y



controles sanos, indicando que los cambios observados ocurren en toda la célula y no está asociada a alguna región en particular.

Los resultados anteriores, expresión de Syk en controles versus pacientes con LES, a los 15 minutos de estimulación vía TCR/CD3-CD28, fueron correlacionados con el índice de actividad de la enfermedad (SLEDAI) y con el tratamiento de los pacientes con corticoesteroides para descartar la influencia de estos parámetros sobre nuestros resultados, no encontrando correlación alguna entre los mismos, lo que apunta a que los hallazgos antes descritos pudieran estar relacionados con eventos innatos de los LT de los pacientes con LES evaluados.

Al analizar la colocalización de Syk con GM1 en LT de pacientes con LES y controles sanos, podemos decir que la tendencia al incremento en la expresión de Syk en controles y pacientes a los 5 minutos de estimulación vía TCR-CD3/CD28, se traduce en una significativamente mayor localización de Syk en la balsa. Estos hallazgos son comparables a los obtenidos por Krishnan y col., (2008), quienes observaron un incremento en la translocación de Syk a las balsas lipídicas de pacientes con LES una vez estimulados los LT, y en nuestro caso, este hallazgo también se cumple en controles sanos. La ubicación de Syk en la balsa garantiza la transducción de señales cascada abajo como consecuencia de la agrupación del FcR $\gamma$  (Krishnan y col., 2008). En el caso de los controles, ya hemos mencionado que Syk parece cumplir un papel importante en la transducción de señales gracias a su plasticidad de expresión en diferentes contextos celulares (Chan y col., 1994).

Considerando el coeficiente de Pearson, podemos decir que en línea general, oscila alrededor de 0,2 y 0,5, es decir que entre el 20 al 50% de las moléculas de Syk se localizan en las balsas en un momento dado, particularmente, en LT de pacientes con LES parece haber mayor cantidad de moléculas en la balsa al estimular durante 5 minutos vía TCR/CD3-CD28. Krishnan y col., (2008) demostraron que Syk tiene una mayor expresión en LT de

pacientes con LES. Sin embargo, logramos observar expresión de Syk en las balsas lipídicas de LT de controles sanos, posiblemente, como se mencionó anteriormente, debido a que esta proteína podría inducir señalización a través del TCR en diferentes contextos celulares (Chan y col., 1994).

Otro de los hallazgos más relevantes obtenidos en esta investigación, fue que al estimular LT de pacientes con LES durante 15 minutos, la localización de Syk en las balsas lipídicas tiende a disminuir ligeramente manteniéndose una diferencia significativa con respecto al basal. Por su parte, en controles sanos observamos que esta colocalización cae a un nivel similar al basal, afianzando la idea de que la mayor expresión de Syk en pacientes que en controles a los 15 minutos, se traduce en su mayor localización en la balsa, posiblemente requerida durante un mayor período de tiempo en esta ubicación de manera que ocurra la transducción de señales cascada abajo dadas las numerosas alteraciones antes descritas en LT de pacientes con LES, referente a CD3 $\zeta$  (Brundula y col., 1999, complejo Grb2/Sos (Cedeño y col., 2003; Cifarrelli, 2003) y LAT (Abdoel y col., 2012) en la fase temprana de la señalización mediadas por el receptor TCR-CD3.

La localización más prolongada de Syk en las balsas lipídicas pudiera contribuir con el estado de hiperestimulación observado en LT de pacientes con LES promoviendo así la ruptura de la tolerancia periférica a autoantígenos. Este recableado en la señalización podría disminuir el umbral de estimulación de los LT de pacientes con LES, conllevando al incremento de la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y fosforilación en tirosina de diferentes proteínas (Tenbrock y col., 2007; Blasini y col., 1998).

Por otra parte, en experimentos no mostrados evaluamos si la fluorescencia roja (Cy3), particularmente, era producto de la contribución del A488 sobre la emisión de la fluorescencia del Cy3 arrojando falsos positivos. Para ello, una vez incubados los LT con el anticuerpo CTB-A488 (verde), tratamos las células con el colorante azul de tripano, el cual al

penetrar la membrana plasmática de las células fijadas o muertas opaca la fluorescencia intracelular, un proceso llamado “quenching” que significa apagar o extinguir la fluorescencia, en este caso, opacando la fluorescencia verde (GM1-A488). Como era de esperarse, el “quenching” disminuyó considerablemente la fluorescencia verde en toda la célula, y observamos de igual manera fluorescencia roja con una IMF similar a la obtenida en ausencia del azul de tripano, indicándonos finalmente que la fluorescencia para Syk era específica del reconocimiento del anticuerpo secundario Cy3, y no parte del solapamiento del A488 (520-580 nm) y Cy3 (567-622 nm) en el pico de emisión.

Relacionado estrechamente con el hallazgo antes descrito, observamos que al evaluar la colocalización de Syk con ZAP-70, logramos observar una mayor colocalización de estas PTKs al estimular durante 15 minutos en LT de pacientes con LES en comparación con controles sanos, siendo similar en los otros tiempos de estimulación evaluados. Esto obedece a lo observado en cuanto a la permanencia de ZAP-70 en las balsas lipídicas, asociada a una mayor localización y/o translocación de Syk a las balsas lipídicas, la cual está relacionada a su vez con el menor nivel de degradación de Syk al estimular durante 15 minutos vía TCR/CD3-CD28. Esta observación afianza la idea de que en LT de pacientes con LES Syk parece ser requerida en la balsa durante un mayor período de tiempo, y por lo tanto colocaliza con ZAP-70 para garantizar que ocurra la transducción de señales cascada abajo dadas las numerosas alteraciones antes descritas, contribuyendo así al estado de hiperactivación descrito en estas células y podría disminuir el umbral de estimulación de los LT de pacientes con LES, conllevando al incremento de la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular y fosforilación en tirosina de diferentes proteínas (Tenbrock y col., 2007; Blasini y col., 1998), conllevando a la ruptura de la tolerancia periférica a autoantígenos.

Nuevamente, los resultados antes mencionados, localización de Syk en las balsas lipídicas y colocalización de Syk con ZAP-70 en LT de controles sanos versus pacientes con

LES a los 15 minutos de estimulación vía TCR/CD3-CD28, fueron correlacionados con el índice de actividad de la enfermedad y con el tratamiento de los pacientes con corticoesteroides, no encontrando correlación alguna entre los mismos, de manera que los hallazgos antes descritos pudieran estar relacionados con eventos innatos de los LT de los pacientes con LES evaluados.

En resumen, merece comentario especial que uno de los hallazgos más interesantes en esta fase del proyecto fue la observación de que al estimular durante 5 minutos se produjo un aumento significativo en la expresión de Syk en LT de pacientes con LES y controles sanos, la cual se mantiene al comparar con el nivel basal de expresión de esta proteína (Western blot), siendo este resultado conforme con la expresión similar de ZAP-70 en pacientes con LES, donde en los eventos de señalización temprana de LT podría entrar en juego la dupla FcR $\gamma$ /Syk en lugar de la vía canónica CD3 $\zeta$ /ZAP-70.

El siguiente hallazgo más impactante fue la observación de que cuando los LT de pacientes con LES fueron estimulados durante 15 minutos vía TCR/CD3-CD28, la expresión de Syk fue relativamente mayor en comparación con controles sanos (microscopía confocal). Además, la estimulación durante 5 minutos por la vía TCR/CD3-CD28 indujo la translocación de Syk a las balsas lipídicas la cual tendió a descender con la estimulación a los 15 minutos, sin embargo, esta no desciende al nivel basal como ocurrió en los LT de controles sanos. Este hallazgo se reflejó en una diferencia significativa a los 15 minutos de estimulación al comparar controles versus pacientes, siendo la localización de Syk en las balsas lipídicas relativamente mayor en pacientes con LES en comparación con controles sanos. Esta diferencia podría ser producto de un estado de activación alterado en pacientes con LES, trayendo como consecuencia una menor ubiquitinación de Syk en estos pacientes. La ubiquitinación conlleva a la internalización de la proteína para ser degradada en los proteasomas, una vez que han sido fosforilados los residuos tirosina de la molécula (Ben-

Neriah, 2002; Ota y col., 2000). Otra posibilidad es que esta molécula es sujeta a modificaciones postransduccionales que hacen que migre de manera diferencial a las balsas lipídicas.

Estas observaciones acentúan la importancia de la localización en las balsas lipídicas de PTKs, especialmente Syk, como elemento central en eventos de señalización temprana en LT de pacientes con LES subsiguiente a la estimulación vía TCR/CD3-CD28. La localización de Syk en las balsas lipídicas durante un tiempo más prolongado puede afianzar la transducción de señales cascada abajo, con la subsiguiente activación de la cascada de las MAPKs quienes determinan el destino de los LT, contribuyendo a su vez al estado de hiperactivación de estas células dando lugar a la eventual ruptura de la tolerancia periférica a autoantígenos.

Entre nuestras perspectivas futuras, contemplamos aumentar el número de experimentos realizados para corroborar las tendencias observadas. Además, queremos evaluar la localización de Syk y ZAP-70 en las balsas lipídicas de LT estimulados vía TCR/CD3-CD28, de controles sanos y pacientes con LES, por gradientes discontinuos de sacarosa. Simultáneamente, investigaremos pacientes no lúpicos, como por ejemplo, individuos con artritis reumatoide en tratamiento con inmunomoduladores e individuos asmáticos como controles de los tratamientos anti-inflamatorios. Como parte de este proyecto de investigación, financiado por COLCIENCIAS bajo la dirección de la Dra. Gloria Vásquez (Medellín, Colombia) sin cuyo apoyo este proyecto no sería posible, investigaremos el nivel de ubicuitinación de ZAP-70 y Syk, así como la actividad proteasomal en LT de pacientes con LES.

Incrementos y/o defectos en la expresión de moléculas señalizadoras cruciales para la transducción de señales luego del ligado del TCR podrían potencialmente contribuir con las anomalías asociadas con la activación de la cascada de las MAPKs de LT de

pacientes con LES. Nuestros resultados pueden ser útiles para entender e ilustrar el mapeo de los eventos de señalización temprana y como las anomalías encontradas por nuestro grupo y otros grupos de investigación pueden repercutir sobre una ruta tan importante para el control de la tolerancia periférica a autoantígenos como es la ruta Ras/Raf/ERK.

En vista de la importancia que cumple Syk como una molécula de señalización fundamental en diversos contextos celulares, como linfocitos, mastocitos, plaquetas, monocitos, macrófagos y osteoclastos, y dado a que éstas están implicadas en la inducción e instauración de la patología tisular en enfermedades autoinmunitarias y alérgicas, así como en diversos tipos de cáncer (linfomas, cáncer de mama, cáncer de próstata, etc), existen múltiples evidencias que sustentan que el foco de la investigación debe estar dirigido al desarrollo de nuevas drogas que bloqueen con mayor especificidad la actividad de Syk. De esta manera, la inhibición de Syk ha adquirido gran interés como una importante herramienta terapéutica, de hecho, ensayos clínicos en pacientes con enfermedades autoinmunitarias, como artritis reumatoide, han mostrado resultados prometedores. A pesar de que faltan muchos aspectos por dilucidar con respecto al papel que cumple Syk en LT de pacientes con LES, este proyecto de investigación aporta pequeñas evidencias acerca del papel crucial de esta proteína en la transducción de señales en LT de pacientes con LES, resaltando su viabilidad como posible blanco terapéutico para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, cáncer, entre otras, con la finalidad de mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

## CONCLUSIONES

- ❖ En nuestra población de LT de pacientes con LES, la expresión similar de ZAP-70 en todos los puntos de estimulación vía TCR/CD3-CD28, al igual que al comparar con controles sanos, parece indicar que los niveles de esta molécula no se ven alterados dada la menor expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo CD3, previamente reportada por nuestro grupo de investigación.
- ❖ En LT de controles sanos, ZAP-70 parece ubicarse en las balsas lipídicas previo a la estimulación vía TCR/CD3-CD28, mientras que al estimular vía TCR/CD3-CD28 los LT de pacientes con LES, se logró inducir una mayor translocación de ZAP-70 a las balsas lipídicas, evento crucial necesario para su activación y función PTK para llevar a cabo la transducción de señales hacia la cascada de las MAPKs. La menor localización de ZAP-70 en las balsas lipídicas de LT de pacientes con LES, a pesar de sus niveles de expresión normales en LT no estimulados, pudiera ser producto de la menor expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR/CD3-CD28 puesto que ZAP-70 es reclutada a las balsas por interacción con la cadena  $\zeta$ .
- ❖ El incremento en la expresión de Syk en LT de pacientes con LES al estimular vía TCR/CD3-CD28, junto con su menor nivel de degradación, posiblemente más tardía, en comparación con controles sanos, pudiera ser producto de un estado de activación alterado dada las múltiples deficiencias en los eventos de señalización temprana vía TCR/CD3-CD28, trayendo como consecuencia una menor

ubiquitinación de esta molécula, garantizando así la transducción de señales cascada abajo.

- ❖ La estimulación de LT vía TCR/CD3-CD28 logra una mayor translocación de Syk a las balsas lipídicas en controles sanos y pacientes con LES, permaneciendo en las balsas lipídicas durante un período más prolongado en los pacientes, posiblemente con la finalidad de garantizar la transducción de señales hacia la cascada de las MAPKs, quienes determinan el destino de la célula; considerando la menor expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo CD3, el menor acoplamiento de Grb2/Sos, el desplazamiento de LAT de las balsas, entre otros hallazgos relacionados con la señalización temprana vía TCR/CD3.
- ❖ La permanencia de Syk en las balsas lipídicas de LT de pacientes con LES estimulados vía TCR/CD3-CD28, se refleja en una mayor colocalización de Syk con ZAP-70, también localizada en las balsas lipídicas para llevar a cabo su función PTK, resaltando el papel crucial de la localización de moléculas clave en las balsas lipídicas para la transducción de señales cascada abajo.

Estas observaciones acentúan la importancia de la localización en las balsas lipídicas de PTKs, especialmente Syk, como elemento central en eventos de señalización temprana en LT de pacientes con LES subsiguiente a la estimulación vía TCR/CD3-CD28. Es posible que cambios en funciones celulares como localización, translocación a las balsas lipídicas, y/o ubiquitinación de esta proteína contribuya como modulador de la respuesta anormal, fenotipo hiperactivado y pérdida de la tolerancia periférica a autoantígenos observado en estos pacientes.



## Referencias Bibliográficas

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. 2012. Cellular and molecular immunology. 7a ed. Madrid, Elsevier.
- Abdoel, N. 2011. Eventos tempranos de la señalización intracelular en linfocitos T de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Tesis de doctorado. IVIC. San Antonio de los Altos. Venezuela.
- Abdoel, N., Brun, S., Bracho, C., Rodríguez, M., Blasini, A. 2012. Linker for activation of T cells is displaced from lipid rafts and decreases in lupus T cells after activation via the TCR/CD3 pathway. *Clin. Immunol.* **142(3)**: 243-251.
- Alcocer-Varela, J., Alarcon-Segovia, D. 1982. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **69**: 1388-92.
- Artyomov, M., Lis, M., Devadas, S., Davis, M., Chakraborty, A. 2010. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107(39)**: 16916-21.
- Bahjat, F., Pine, P., Reitsma, A., Cassafer, G., Baluom, M., Grillo, S. 2008. An orally bioavailable spleen tyrosine kinase inhibitor delays disease progression and prolongs survival in murine lupus. *Arthritis Rheum.* **58**:1433–44.
- Ben-Neriah, Y. 2002. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol.* **3**: 20-26.
- Berton, G., Mocsai, A., Lowell, A. 2005. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends. Immunol.* **26**: 208-214.
- Blasini, A., Rodríguez, M. 2004. Altered signaling triggered by ligation of the TCR/CD3 receptor in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus: the road from anergy to autoimmunity. *Int. Rev. Imm.* **23(3-4)**: 265-272.
- Blasini, A., Brundula, V., París, M., Rivas, L., Salazar, S., Stekman, I., Rodríguez, M. 1998. Protein tyrosine kinase activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* **11**: 387-393.
- Blasini, A., Chacon, R., Riera, R., Stekman, I., Rodriguez, M. 1998. Abnormal pattern of tyrosine phosphorylation in unstimulated peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* **7**: 515-523.
- Borst, J., Coligan, J., Oettgen, H., Pessano, S., Malin, R., y col. 1984. The delta-and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature.* **312**: 455–458.
- Brdicka, T., Cerny, J., Horejsi, V. 1998. T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**: 356-360.
- Brdicka, T., Pavlistova, D., Leo, A. 2000. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J. Exp. Med.* **191**: 1591–1604.
- Broere, F., Apasov, S., Sitkovsky, M., van Eden, Willem. 2011. T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Springer.* **3**: 15-27.
- Bromley, S., Burack, W., Johnson, K., Somersalo, K., Sims, T., Sumen, C., Davis M., Shaw, A., Allen, P., Dustin, M. 2001. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 375-96.

- Brundula, V., Rivas, L., Blasini, A., París, M., Stekman, I., Salazar, S., Riera, R., Rodríguez, M. 1999. Diminished levels of TcR  $\zeta$  chains in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **42**: 1908-1916.
- Bubeck Wardenburg, J., Fu, C., Jackman, J., Flotow, H., Wilkinson, S., y col. 1996. Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J. Biol. Chem.* **271**: 19641–19644.
- Cantrell, D. 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 259–274.
- Cedeño, S. 2000. Papel de las MAPK en la señalización intracelular de linfocitos T de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Trabajo de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Cedeño, S., Cifarelli, D., Blasini, A., París, M., Pláceres, F., Alonso, G., Rodríguez, M. 2003. Defective activity of ERK-1 and ERK-2 mitogen activated protein kinases in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus: potential role of altered coupling of Ras guanine nucleotide exchange factor hSos to adapter protein Grb2 in lupus T cells. *Clin. Immunol.* **106**: 41-49.
- Celhar, T., Magalhaes, R., Fairhurst, A. 2012. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunology Research.* **53**: 58-77.
- Chan, A., Desai, D., Weiss, A. 1994. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 555–592.
- Chan, A., Iwashima, M., Turck, C., Weiss A. 1992. ZAP-70: a 70 kDa protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell.* **71**: 649–662.
- Chan, A., Van Oers, N., Tran, A. 1994. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J. Immunol.* **152(10)**: 4758-66.
- Chan, A., Van Oers, N., Tran, A., Turka, L., Law, C., Ryan, J., Clark, E., Weiss, A. 1994. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J. Immunol.* **152**: 4758–4766.
- Charbonneau, H., Diltz, C., Tonks, N. 1988. Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochem.* **27**: 8695-8701.
- Cheng, A., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J., Pawson, T. 1995. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature.* **378(6554)**: 303-6.
- Chiu, C., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T., Chan, A. 2002. BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *EMBO J.* **21**: 6461–6472
- Chu, D., Morita, C., Weiss, A. 1998. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* **165**: 167–180.
- Chu, D., Morita, C., Weiss, A. .1998. The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* **165**: 167-80.
- Cifarrelli, F. 2003. Papel de la proteína adaptadora Grb2 en la señalización intracelular vía TcR/CD3 en linfocitos T de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Trabajo de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Coopman, P., Do, M., Barth, M., Bowden, E., Hayes, A., Basyuk, E., Blancato, J., Vezza, P., McLeskey, S., Mangeat, P., Mueller, S. 2000. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature.* **406(6797)**:742-7.

- Crispín, J., Kyttaris, V., Juang, Y., Tsokos, G. 2008. How signaling and gene transcription aberrations dictate the systemic lupus erythematosus T cell phenotype. *Trends. Immunol.* **29**: 110-115.
- Crispín, J., Liossis, S., Kis-Toth, K., Lieberman, L., Kyttaris, V., Juang, Y., Tsokos, G. 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends. Mol. Med.* **16(2)**: 47–57.
- Crowley, M., Costello, P., Fitzer-Attas, C., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V., DeFranco, A. 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **186**: 1027-1039.
- Davis, D. 2002. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol.* **23**:356.
- Dayal, A., Kammer, G. 1996. The T cell enigma in lupus. *Arthritis Rheum.* **39**:23–33.
- Deng, G., Liu, L., Bahjat, F., Pine, P., Tsokos, G. 2010. Suppression of skin and kidney disease by inhibition of spleen tyrosine kinase in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* **62**: 2086–2092.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* **(11)**: 1032-9.
- Dustin, M. 2002. Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. *J Clin Invest.* **109(2)**: 155–160.
- Dustin, M., Chan, A. 2000. Signaling takes shape in the immune system. *Cell.* **103**: 283.
- Elder, M., Lin, D., Clever, J., Chan, A., Hope, T., Weiss, A., Parslow, T. 1994. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science.* **264**: 1596-1599.
- Erick, J., James, C., Koretzky, G. 1998. Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr. Op. Immunol.* **10**: 334-337.
- Fields, P., Gajewski, T., Fitch, F. 1996. Blocked ras activation in anergic CD4<sup>+</sup> T cells. *Science.* **271**: 1276-1278.
- Fleischer, S., Giesecke, C., Mei, H., Lipsky, P., Daridon, C., Dörner, T. 2014. Increased Frequency of a Unique Spleen Tyrosine Kinase Bright Memory B Cell Population in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* **66(12)**: 3424-35.
- Flores-Borja, F., Kabouridis, P., Jury, E., Isenberg, D., Mageed, R. 2005. Decreased Lyn Expression and Translocation to Lipid Raft Signaling Domains in B Lymphocytes From Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* **52**: 3955–3965.
- Fu, C., Turck, C., Kurosaki, T., Chan, A. 1998. BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity.* **9**: 93–103.
- Geahlen, R. 2014. Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target. *Trends Pharmacol. Sci.* **35(8)**: 414-22.
- Grammatikos, A., Ghosh, D., Devlin, A., Kyttaris, V., Tsokos, G. 2013. Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Regulates Systemic Lupus Erythematosus (SLE) T Cell Signaling. *Plos ONE.* **8(8)**: e74550.
- Grammatikos, A., Tsokos, G. 2012. Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. *Trends. Mol. Med.* **18**: 101-108.
- Groesch, T., Zhou, F., Mattila, S., Geahlen, RL. 2006. Structural basis for the requirement of two phosphotyrosine residues in signaling mediated by Syk tyrosine kinase. *J. Mol. Biol.* **356**: 1222–1236.
- Hayes, S., Love, P. 2006. Strength of signal: a fundamental mechanism for cell fate specification. *Immunol. Rev.* **209**: 170–175.

- Hedrick, S., Cohen, D., Nielsen, E., Davis, M. 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane-associated proteins. *Nature*. **308**:149–153.
- Irving, B., Chan, A., Weiss, A. 1993. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J. Exp. Med.* **177**: 1093–1103.
- Isenberg, D., Ehrenstein, M., Longhurst, C., Kalsi, J. 1994. The origin sequence structure and consequences of developing anti-DNA antibodies. A human perspective. *Arthritis Rheum.* **37**: 169-180.
- Janes, P., W., Ley, S., Magee, A., Kabouridis, S. 2000. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* **12**: 23–34.
- Jury, E., Kabouridis, P., Abba, A., Mageed, R., Isenberg, D. 2003. Increased ubiquitination and reduced expression of LCK in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **48**: 1343-1354.
- Jury, E., Kabouridis, P., Flores-Borja, F., Mageed, R., Isenberg, D. 2004. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **113**: 1176-1187.
- Kabouridis, P., Janzen, J., Magee, A., Ley, S. 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **30**: 954–963.
- Kabouridis, P., Jury, E. 2008. Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity. *FEBS Lett.* **582(27)**: 3711–3718.
- Kabouridis, P., Magee, A., Ley, S. 1997. S-acylation of LCK protein tyrosine is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J.* **16**:4983–4998.
- Kane, L., Lin, J., Weiss, A. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 242-249.
- Kaneko, H., Saito, K., Hashimoto, H., Yagita, H., Okumura, K., Azuma, M. 1996. Preferential elimination of CD28<sup>+</sup> T cells in systemic lupus erythematosus (SLE) and the relation with activation-induced apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* **106**: 218-229.
- Koretzky, G. 1997. The role of Grb2 associated proteins in T cell activation. *Immunol. Today.* **18**: 401-406.
- Koretzky, G., Abtahian, F., Silverman, M. 2006. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 67–78.
- Kosugi, A., Saitoh, S., Noda, S., Yasuda, K., Hayashi, F., Ogata, M., Hamoka, T. 1999. Translocation of tyrosine-phosphorylated TCR $\zeta$  chain to glycolipid-enriched membrane domains upon T cell activation. *Int. Immunol.* **11**: 1395-1401.
- Kovacs, B., Vassilopoulos, D., Vogelgesang, S., Tsokos, G. 1996. Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF- $\alpha$ . *Clin. Immunol. Immunopathol.* **81**: 293-302.
- Krangel, M. 2009. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.* **21**: 133–139.
- Krishnan, S., Farber, D., Tsokos, G. 2003. T cell rewiring in differentiation and disease. *J. Immunol.* **171**: 3325–3331
- Krishnan, S., Juang, Y., Chowdhury, B., Magilavy, A., Fisher, C. y col. 2008. Differential expression and molecular associations of Syk in systemic lupus erythematosus T cells. *J. Immunol.* **181**: 8145-8152.
- Krishnan, S., Nambiar, M., Warke, V., Fisher, C., Mitchell, J., Delaney, N., Tsokos, G. 2004. Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **172**: 7821–7831.

- Krishnan, S., Warke, V., Nambiar, M., Tsokos, G., Farber, D. 2003. The FcR $\gamma$  subunit and Syk kinase replace the CD3 $\zeta$ -chain and ZAP-70 kinase in the TCR signaling complex of human effector CD4 T cells. *J. Immunol.* **170**: 4189–4195.
- Kurosaki, T., Takata, M., Yamanashi, Y., Inazu, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T., Yamamura, H. 1994. Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* **179(5)**: 1725–1729.
- Kyttaris, V. 2010. Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage. *Methods. Mol. Biol.* **662**: 265-283.
- Langlet, C., Bernard, A., Drevot, P., He, H. 2000. Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 250-255.
- Latour, S., Fournel, M., Veillette, A. 1997. Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4434-4441.
- Lawrence, S., Andrew, P., Elise, L., Richard, K. 1990. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4358-4362.
- Leo, A., Schraven, B. 2001. Adapters in lymphocyte signalling. *Curr. Opin. Immunol.* **13**: 307-316.
- Letourneur, F., Klausner, R. 1992a. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science.* **255**: 79–82.
- Letourneur, F., Klausner, R. 1992b. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell.* **69**: 1143–1157.
- Li, Wei., Whaley, C., Mondino, A., Mueller, D. 1996. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4<sup>+</sup> T cells. *Science.* **271(5253)**: 1272-1276.
- Linker-Israeli, M., Bakke, A., Kitridou, R., Gendler, S., Gillis, G., Horwitz, D. 1983. Defective production of interleukin 1 and 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Immunol.* **130**: 2651-2655.
- Liossis, S., Ding, X., Dennis, G., Tsokos, G. 1998. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J. Clin. Invest.* **101**: 1448-1457.
- Liu, S., Fang, N., Koretzky, G., McGlade, C. 1999. The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr. Biol.* **9**: 67–75.
- Lorenz, H., Grünke, M., Hieronymus, T., Herrmann, M., Kühnel, A., Manger, B., Kalden, J. 1997. In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* **40(2)**: 306-17.
- Malissen, M., Minard, K., Mjolsness, S., Kronenberg, M., Goverman, J., et al. 1984. Mouse T cell antigen receptor: structure and organization of constant and joining gene segments encoding the beta polypeptide. *Cell.* **37**: 1101–1110.
- Mallick-Wood, C., Pao, W., Cheng, A., Lewis, J., Kulkarni, S., Bolen, J., Rowley, B., Tigelaar, R., Pawson, T., Hayday, A. 1996. Disruption of epithelial  $\gamma\delta$  T cell repertoires by mutation of the Syk tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:9704–9709.
- Meltzer, O., Berkowitz, RB., Grossbard, E. 2005. An intranasal Syk-kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **115 (4)**: 791-6.
- Michel, F., Attal-Bonnefoy, G., Mangino, G., Mise-Omata, S., Acuto, O. 2001. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity.* **15(6)**: 935-945.

- Mindy, L., Tsokos, G. 2008. T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatology*. **23**: 8-7.
- Monks, C., Freiberg, B., Kupfer, H., Sciaky, N., Kupfer, A. 1998. Three dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. **395**: 82.
- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M., Chauvin, J., Pierres, M., He, H. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J*. **17**: 5334-5348.
- Moran, M., Miceli, M. 1998. Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity*. **9**: 787-796.
- Morgan, B., Walport, M. 1991. Complement deficiency and disease. *Immunol. Today*. **12**: 301-306.
- Moroy, T., Karsunky, H. 2000. Regulation of pre-T-cell development. *Cell. Mol. Life Sci*. **57**:957-975.
- Morrow, J., Nelson, L., Watts, R., and Isenberg, D. 1999. Systemic lupus erythematosus. *Autoimmune rheumatic disease*.**2**: 56-103.
- Moulton, V., Tsokos, G. 2011. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther*. **13**:207.
- Murphy, K., Travers, P. Walport, M. 2009. Inmunología de Janeway. Mc Graw Hill, Séptima edición, D.F., Mexico.
- Nambiar, M., Fisher, C., Kumar, A., Tsokos, C., Warke, V., Tsokos, G. 2003. Forced expression of the Fc receptor gamma-chain renders human T cells hyperresponsive to TCR/CD3 stimulation. *J Immunol*. **170**: 2871-2876.
- Nishiyama, S., Manabe, N., Kubota, Y., Ohnishi, H., Kitanaka, A., Tokuda, M., Taminato, T., Ishida, T., Takahara, J., Tanaka, T. 2005. Cyclosporin A inhibits the early phase of NF-kappaB/RelA activation induced by CD28 costimulatory signaling to reduce the IL-2 expression in human peripheral T cells. *Int. Immunopharmacol*. **5(4)**: 699-710.
- Oh-hora, M., Rao, A. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol*. **20**: 250-258.
- Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B. 2003. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol*. **3(4)**: 317-30.
- Oliver, J., Burg, D., Wilson, B., McLaughlin, J., Geahlen, R. 1994. Inhibition of mast cell FcγR1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J. Biol. Chem*. **269**: 29697-29703.
- Orchansky, P., Matsuuchi, L., Ericsson, P., The, H. 1996. Differential regulation of p<sup>72</sup>syk expression in naive and proliferating CD4-CD8+ T cells. *Mol. Immunol*. **33**: 835-84.
- Ota, S., Hazeki, K., Rao, N., Lupher, M., Andoniou, C., Drukeri, B., Band, H. 2000. The RING Finger Domain of Cbl Is Essential for Negative Regulation of the Syk Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem*. **1**: 414-422.
- Paccani, S., Ulivieri, C., Mercati, D., Pacini, S., Patrussi, L., Hirst, T., Lupetti, P., Baldari, C. 2002. F-actin dynamics control and segregation of the TcR signaling cascade to clustered lipid rafts. *Eur. J. Immunol*. **32(2)**: 435-46.
- Palacios, E., Weiss, A. 2007. Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *J. Exp. Med*. **204**: 1703-1715.
- Pang, M., Setoyama, Y., Tsuzaka, K., Yoshimoto, K., Amano, K., Abe, T., Takeuchi, T. 2002. Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor ζ chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Exp. Immunol*. **129**:160.
- Pérez-Rodríguez, M. 2005. HLA y enfermedad. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc*. **43**: 91-93.

- Pivniouk, V., Tsitsikov, E., Swinton, P., Rathbun, G., Alt, F., Geha, R. 1998. Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell*. **94**: 229–238.
- Qian, D., Mollenauer, M., Weiss, A. 1996. Dominant-negative  $\alpha$ -associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* **183**: 611–620.
- Reveille, J. 2006. The genetic basis of autoantibody production. *Autoimmun. Rev.* **5(6)**: 389-98.
- Male, D., Roitt, I., Brostoff, J., Roth, D. 2012. Immunology. 8<sup>o</sup> Ed. Elsevier. Reino Unido, Londres.
- Rynes, R. 1991. Inherited complement deficiency and disease. *Immunol. Today*. **12**: 301-306.
- Sabater, L. 2007. Mecanismos moleculares de tolerancia central. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Sada, K., Takano, T., Yanagi, S., Yamamura, H. 2001. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biochem.* **130(2)**: 177-86.
- Samelson, L., Patel, M., Weissman, A., Harford, J., Klausner, R. 1986. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell*. **46**: 1083–1090.
- Samelson, L., Phillips, A., Luong, E., Klausner, RD. 1990. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**:4358–4362.
- Sanchez-Lockhart, M., Marin, E., Graf, B., Abe, R., Harada, Y., Sedwick, C., Miller, J. 2004. Cutting edge: CD28-mediated transcriptional and posttranscriptional regulation of IL-2 expression are controlled through different signaling pathways. *J. Immunol.* **173(12)**: 7120-4.
- Schweighoffer, E., Vanes, L., Mathiot, A., Nakamura, T., Tybulewicz, V. 2003. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity*. **18**: 523-533.
- Simons y Toomre, 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1(2000)**: 31–39.
- Simons, K., Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387(6633)**:569-72.
- Smith-Garvin, J., Koretzky, G., Jordan, M. 2009. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**: 591–619.
- Solomon, E., Juang, Y., Gourley, M., Kammer, G., Tsokos, G. 2001. Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **166**: 4216-4222.
- Stekman, I., Blasini, A., Leon-Ponte, M., Baroja, M., Abadí, I., Rodríguez, M. 1991. Enhanced CD3-mediated T lymphocyte proliferation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **34**: 459-467.
- Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 127–135.
- Takahama, Y., Nitta, T., Mat Ripen, A., Nitta, S., Murata, S., y col. 2010. Role of thymic cortex-specific selfpeptides in positive selection of T cells. *Semin. Immunol.* **22**: 287–293.
- Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., Kurosaki, T. 1994. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways. *EMBO*. **13**: 1341–1349.
- Tan, E., Cohen, A., Fries, J., Masi, A., McShane, D., Rothfield, N., Schaller, J., Talal, N., Winchester, R. 1998. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **25**: 1271-1277.

- Tao, Y., Kupfer, R., Stewart, B., Williams-Skipp, C., Crowell, C., Patel, D., Sain, S., Scheinman, R. 2005. AIRE recruits multiple transcriptional components to specific genomic regions through tethering to nuclear matrix. *Mol. Immunol.* **43(4)**: 335-45.
- Tohyama, Y., Yamamura, H. 2009. Protein tyrosine kinase, Syk: a key player in phagocytic cells. *J. Biochem.* **145**: 267-273.
- Tomlinson, M., Lin, J., Weiss, A. 2000. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signalling. *Immunol. Today.* **21**: 584–591.
- Trowbridge, I., Thomas, M. 1994. CD45: An emerging role as protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Ann. Rev. Immunol.* **12**: 85-116.
- Tsokos, G., Liossis, S. 1999. Immune cell signalling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol. Today.* **20**: 119–124.
- Turner, M., Mee, P., Costello, P., Williams, O., Price, A., Duddy, L., Furlong, M., Geahlen, R., Tybulewicz, V. 1995. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature.* **378**: 298-302.
- Valitutti, S., Müller S., Cella, M., Padovan, E., Lanzavecchia, A. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide–MHC complexes. *Nature.* **375**: 148 – 151.
- Van Leeuwen, J., Samelson, L. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 242–248.
- Veillette, A., Bookman, M., Horak, E., Bolen, J. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell.* **55**: 301–308.
- Via, C., Hendwerger, B. 1993. B-cell and T-cell function in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **5**: 570-574.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., Lanzavecchia, A. 1999. T Lymphocyte coestimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science.* **283(5402)**: 680-682.
- Wang, H., Kadlecsek, T., Au-Yeung, B., Goodfellow, H., Hsu, L., y col. 2010. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* **2**: a002279.
- Weber, J., Bell, G., Han, M., Pawson, T., Imboden, J. 1992. Association of the tyrosine kinase lck with phospholipase C $\gamma$ -1 after stimulation of the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* **176**: 373-379.
- Weinblatt, M., Kavanaugh, A., Genovese, M., Musser, T., Grossbard, E., Magilavy, D. 2010. An Oral Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Inhibitor for Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **363**: 1303–1312.
- Weiss, A. 1991. Molecular and genetic insights into T-cell antigen receptor structure and function. *Ann. Rev. Genet.* **25**: 489-510.
- Wu, J., Katzav, S., Weiss, A. 1995. A functional T cell receptor signaling pathway is required for p95<sup>vav</sup> activity. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4337-4346.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., Seed, B. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity.* **8**: 723-732.
- Zhang, W., Samelson, L. 2000. The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling. *Semin. Immunol.* **12(1)**: 35-41.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Triple, R., Samelson, L. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell.* **92**: 83–92.
- Zhang, W., Triple, R., Samelson, L. 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity.* **9**: 239–246.



- Zhang, Y., Dong, C. 2005. MAP kinases in immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* **2(1)**: 20-27.
- Zhong, X., Guo, R., Zhou, H., Liu, C., Wan, C. 2008. Diacylglycerol kinases in immune cell function and self-tolerance. *Immunol. Rev.* **224**: 249–264.
- Zuniga-Pflucker, J. 2004. T-cell development made simple. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 67–72.

Consultas en línea:

- <http://datasheets.scbt.com/sc-574.pdf>
- <http://datasheets.scbt.com/sc-28337.pdf>
- <http://trenchesofdiscovery.blogspot.com/2012/03/immunology-under-microscope-knowing.html>

## APÉNDICE I

**TABLA 1. Resumen de datos recolectados de controles sanos y pacientes con LES.**

GRUPO	N° TOTAL	EDAD (AÑOS)		SEXO	DURACIÓN ENF. (AÑOS)			SLEDAI		
		PROM.	RANGO	F	PROM.	RANGO	PROM.	RANGO		
Control sano	26	33,89	21 - 59	23	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
LES	21	40,43	22 - 63	21	8,72	0,5 - 20	2	0 - 6		

GRUPO	PREDNISONA (mg/día)			CICLOFOS- FAMIDA ( 1 g/pulso)	AINES diario	AZATIOPRINA (mg/15d)			CLOROQUINA/HCQ (mg/d)		
	N°	PROM.	RANGO	N°	N°	N°	PROM.	RANGO	N°	PROM.	RANGO
Control sano	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LES	19	9,16	5 - 25	2	0	4	112,5	50 - 150	11	270	150 - 500

Donde: LES: lupus eritematoso sistémico. SLEDAI: Índice de actividad clínica del LES. FARME: Fármacos modificadores de la enfermedad. HCQ: Hidroxicloroquina. N/A: No apli

## APÉNDICE II

### Preparación de soluciones

#### ***Acrilamida/bisacrilamida 30%***

Acrilamida	29,2 g
N, N'-Bis-metilen-acrilamida (Bis-acrilamida)	0,8 g

Se disolvieron en 80 mL de agua destilada, se llevó a un volumen final de 100 mL y se pasó por un filtro Whatman N°1. Se guardó protegida de la luz a 4 °C.

#### ***Buffer carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (NaHCO<sub>3</sub> 19 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 28 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %)***

Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	1,59 g
Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	2,93 g
Azida de sodio (NaN <sub>3</sub> )	0,2 g

Se disolvieron en agua bidestilada, se ajustó el pH a 9,6 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y se llevó a 1 L con agua bidestilada. Se filtró por una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm y se guardó a 4 °C.

#### ***Buffer cargador 4X o Laemli (azul de bromofenol 0,25%, Tris 62.5 mM, glicina 10%, SDS 10%, 2-β-mercaptoetanol 5%)***

Azul de bromofenol 10 %	0,2 mL
Tris 0,5 M pH 6,8	1 mL
Glicina	0,8 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	1,6 mL
2-β-mercaptoetanol 0,7%	0,4 mL

Se diluyeron en 4 mL de agua destilada para un volumen final de 8 mL. Se dividió en alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -20°C.

#### ***Buffer de corrida o electrodo 5X, pH 8.3 (Tris 0,12 M, glicina 0,96 M, SDS 5%)***

Tris base	9 g
Glicina	43,2 g
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	3 g

Se disolvieron en 400 mL de agua destilada y se llevó a un volumen final de 600 mL con agua destilada. La solución se almacenó a 4 °C.

**Buffer de transferencia, pH 8.3 (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%)**

Tris base	3,03 g
Glicina	14,4 g
Metanol	200 mL

Se disolvieron en 800 mL de agua destilada y se llevó a un volumen final de 1 L con agua destilada. La solución se almacenó a 4 °C.

**Buffer fosfato salino (BFS) 10 X, pH 7.4 (NaCl 1.37 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM, KCl 27 mM)**

Cloruro de sodio (NaCl)	80 g
Fosfato hidrogenado de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	11,36 g
Fosfato di-hidrogenado de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g
Cloruro de potasio (KCl)	2 g

Se disolvieron en 800 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7,4 con ácido clorhídrico (HCl) 1 N y se llevó a un volumen de 1 L con agua destilada. Se almacenó a temperatura ambiente.

**Buffer IGEPAL® (Tris pH 8.1 50 mM, NaCl 150 mM, IGEPAL® 1%, EDTA 2 mM)**

Tris pH 8,1 1M	5 mL
Cloruro de sodio (NaCl) 2 M	7,5 mL
IGEPAL® 100%	1 mL
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 M	0,40 mL

Se diluyeron en 70 mL de agua destilada y se llevó a un volumen final de 100 mL. Se almacenó a 4 °C.

**Buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8**

Tris base	27,23 g
-----------	---------

Se disolvió en 80 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 8,8 con ácido clorhídrico (HCl) 1 N y se llevó a un volumen final de 150 mL con agua destilada. Se almacenó a 4 °C.

**Buffer tris-HCl 0.5 M, pH 6.8**

Tris base	6 g
-----------	-----

Se disolvió en 60 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 6,8 con ácido clorhídrico (HCl) 1N, y se llevó a un volumen final de 100 mL de agua destilada. Se almacenó a temperatura ambiente.

**Buffer Tris-Salino (BTS) 10 X, pH 8.0 (Tris 100 mM, NaCl 1.5 M)**

Tris base	12,1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	87,7 g

Se disolvieron en 800 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 8,0 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y se llevó a un volumen de 1 L con agua destilada. Se almacenó a temperatura ambiente.

***Ficoll (d = 1,077 g/mL)***

Ficoll	47,5 g
Conray 60%	125 mL

Se disolvieron en 580 mL de agua bidestilada y se ajustó la densidad en un picnómetro a 1,077 g/mL. Se filtró la solución a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm y se guardó protegida de la luz a 4 °C.

***Medio RPMI 1640***

RPMI 1640	10,4 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	2 g

Se disolvieron en 900 mL de agua bidestilada y se ajustó el pH a 7,0 con ácido clorhídrico (HCl) 1N. se llevó a 1 L con agua bidestilada. Se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm y se conservó a 4°C.

***Medio RPMI suplementado (SFB 10%, L-glutamina 1%, penicilina/estreptomicina 2%)***

Suero fetal bovino (SFB)	10 mL
L-glutamina 0,2 M	1 mL
Penicilina/Estreptomicina 10000 U/mL	2 mL

Se diluyeron en 80 mL medio RPMI 1640 y se completó a un volumen de 100 mL con medio RPMI 1640.

***Mowiol (mowiol 13%, glicerol 33,33%, Tris pH 8,5 13 mM, DABCO 2,5%)***

Para preparar la solución protectora de la fluorescencia, se agregaron 2,4 g de Mowiol 4-88 (Hoescht) a 6 mL de glicerol. Se mezcló y dejó a temperatura ambiente durante varias horas. Posteriormente, se agregó 12 mL de buffer Tris 0,2 M a pH 8,5, y se calentó a 50°C durante 10 minutos mezclando ocasionalmente. Al disolver el Mowiol, se centrifugó a 5000 x g durante 15 minutos para clarificar la solución y a la mezcla final se le agregó 2,5 % de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO). La solución fue alicuotada y almacenada a -20°C.

***Solución de bloqueo A para Inmunoblot (leche en polvo descremada Carnation 3%, Tween 20 0,1%, BFS 1X pH 7,2)***

Leche en polvo descremada Carnation 1,5 g

Tween 20 0,05 mL

Se disolvieron en 50 mL de BFS 1X y se almacenó a 4 °C.

***Solución de bloqueo B para Inmunoblot (leche en polvo descremada Carnation 5%, Tween 20 0,05%, BTS 1X pH 8)***

Leche en polvo descremada Carnation 2,5 g

Tween 20 0,025 mL

Se disolvieron en 50 mL de BTS 1X y se almacenó a 4 °C.

***Solución de lavado para Citometría de flujo (ASB 1%, NaN<sub>3</sub> 0,02% en BFS 1X pH 7,2)***

Albúmina sérica bovina (ASB) 5 g

Azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) 0,1 g

Se disolvieron en 500 mL de BFS 1X y se almacenó a 4 °C.

***Solución de lavado para Microscopía Confocal (ASB 3%, HEPES 10 mM en BFS 1X pH 7,2)***

Albúmina sérica bovina (ASB) 3 g

HEPES 0,24 g

Se disolvieron en 100 mL de BFS 1X y se almacenó a 4 °C.

### APENDICE III

#### OTROS REACTIVOS Y MATERIALES

- DABCO (1,4-diazobicyclo-[2,2,2]-octano). Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- Heparina 1000 U/mL. Eli Lilly, Maracay, Venezuela.
- L-glutamina, GIBCO, Invitrogen, EUA.
- Mowiol, Hoescht, Alemania.
- N, N', N', N', -tetra-metil-etilen-diamina (TEMED). Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- IGEPAL: detergente no iónico que se emplea para el aislamiento de complejos funcionales de membrana. Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- Películas fotográficas X-OMAT GBX-2, Kodak, Rochester, NY, EUA.
- Penicilina/Estreptomicina. GIBCO, Invitrogen, EUA.
- Perlas anti-CD3ε/anti-CD28: Perlas paramagnéticas recubiertas de poliestireno que en su superficie tienen una mezcla óptima de anticuerpos monoclonales contra las moléculas de superficie CD3ε y CD28 humano (DYNAL, Invitrogen, USA).
- Persulfato de amonio. Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- Poli-L-lisina. Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween-20). Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- Reactivos para la detección de anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate. Pierce, Rockford, IL, EUA.
- Revelador y fijador. Kodak, Rochester, NY, EUA.
- Rojo Ponceau para tinción de proteínas. Sigma, St. Louis, MO, EUA.
- RossetteSep™ *Human T Cell Enrichment Cocktail* que contiene anticuerpos del tipo IgG1 producido en ratones contra las moléculas CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, y anti-CD66b y glicoforina A de origen humano.
- SFB Purified. GIBCO, Invitrogen, EUA.
- Solución salina isotónica. Lab. Behrens, Caracas, Venezuela.
- Triton X-100. Detergente no iónico que se utiliza para el aislamiento de complejos funcionales de membrana. Sigma, St. Louis, MO, EUA.

## APÉNDICE IV

### ANTICUERPOS UTILIZADOS Y SUS DILUCIONES

- Anti-CD14-FITC: AcM del tipo IgG producido en ratones conjugado a FITC. Reconoce el receptor CD14 de monocitos y macrófagos (DAKO, Dinamarca).
- Anti-CD20-FITC: AcM del tipo IgG producido en ratones conjugado a FITC. Reconoce a CD20 involucrada en la regulación de la activación y diferenciación de los LB (DAKO, Dinamarca).
- Anti-CD28: AcM derivado del clon 28.2 que reconoce IgG1  $\kappa$ , de origen humano, utilizado para estimulación in vitro de linfocitos T (BD Pharmingen).
- Anti-CD3: AcM del tipo IgG producido en ratones. Reconoce el receptor CD3 de linfocitos T (DAKO, Dinamarca).
- Anti-Ig de conejo A488 (GAR-A488): AcP producido en cabra que reconoce IgG de conejo, conjugado a Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch, Inc, Pensilvania, EUA).
- Anti-Ig de conejo A647 (GAR-A647): AcP producido en cabra que reconoce IgG de conejo, conjugado a Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch, Inc, Pensilvania, EUA).
- Anti-Ig de conejo FITC (GAM-FITC): AcM producido en cabra que reconoce Igs de conejo, conjugado a isotiocianato de fluoresceína (Coulter Corp, Hialeah, FL, EUA).
- Anti-Ig de conejo FITC (GAR-HRP): AcM producido en cabra que reconoce Igs de conejo, conjugado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Texas, USA).
- Anti-Ig de ratón (GAM): AcM producido en cabra que reconoce las cadenas ligeras y pesadas de Igs de ratón (Biosource International, CA, EUA).
- Anti-Ig de ratón Cy3 (GAM-Cy3): AcM anti-mouse de clase IgG producido en cabra conjugado a TRITC (del inglés *tetramethyl rhodamine isothiocyanate*) (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.).
- Anti-Ig de ratón FITC (GAM-HRP): AcM producido en cabra que reconoce Igs de ratón, conjugado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Texas, USA).
- Anti-Syk: AcM del tipo IgG2a producido en ratones. Reconoce la secuencia de aminoácidos 257-352 de la proteína Syk de humanos (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Texas, USA).
- Anti-ZAP-70: AcM del tipo IgG producido en conejo. Reconoce un epítipo dentro de la región adaptadora de la proteína ZAP-70 de humanos (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Texas, USA).
- Anti- $\alpha$ -actina: AcP producido en conejos. Reconoce el fragmento C-terminal de la proteína actina (Sigma, Aldrich, Inc. EUA).
- CTB-A488: Subunidad B de la toxina de cólera conjugada a Alexa 488 que reconoce al gangliósido GM1 y que es excitado a 488 nm y emite fluorescencia verde (500-530 nm) en el rango visible (Molecular Probes, Inc, USA).
- OKT3: AcM de la clase IgG2a producido en ratones, el cual reconoce un epítipo conformacional formado por la cadena  $\epsilon$  asociada a la cadena  $\gamma$  y  $\delta$  del complejo CD3 de los linfocitos T



humanos. Este anticuerpo es purificado en nuestro laboratorio, mediante cromatografía con proteína A-sefarosa (Sigma, MO, USA), a partir de líquido ascítico obtenido en ratones Balb-c inoculados con células del hibridoma OKT3, clona productora de AcM OKT3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA).

- Suero P producido en cabra: suero policlonal producido en cabra contra antígenos diversos utilizado para bloquear sitios inespecíficos de unión a anticuerpos y receptores Fc de células de origen inmunológico.

### **Concentración de anticuerpos**

**Tabla 2. Protocolo para la incubación de CMSP para citometría de flujo.**

Ac. Primario	Volumen (µL)	Ac. Secundario	Volumen (µL)
-----		GAM-FITC	5
CD3	5	GAM-FITC	5
-----		Isotipo IgG2a-FITC	5
-----		CD20-FITC	5
-----		CD14-FITC	5
-----		CD68-FITC	5

**Tabla 3. Protocolo para la incubación de linfocitos T para inmunoblot.**

Ac. Prim.	Sol. Bloqueo. Leche descrem. Carnation (1h)	Conc. toda la noche (µg/mL)	Lavados (30 seg)	Ac. Secund.	Conc. toda la noche (µg/mL)	Lavados (30 seg)
AcP anti-ZAP-70	5% en BTS 1X con 0,05% T-20	0,4	2 con BTS 1X al 0,05% T-20 1 con BTS 1X	Anti Ig conejo HRP	0,04	1 con BTS 1x al 0,05% T-20 2 con BTS 1X
AcM anti-Syk	3% en BFS 1X con 0,1% T-20	0,4	2 con BFS 1X al 0,1% T-20 1 con BFS 1X	Anti Ig ratón HRP	0,04	1 con BFS 1x al 0,1% T-20 2 con BFS 1X
AcP anti-α-actina	5% en BTS 1X con 0,05% T-20	1	2 con BTS 1X al 0,05% T-20 1 con BTS 1X	anti-rabbit	0,04	1 con BTS 1x al 0,05% T-20 2 con BTS 1X

**Tabla 4. Protocolo para la incubación de linfocitos T para microscopía confocal.**

Ac. Primario	Concentración (µg/mL)	Ac. secundario	Concentración (µg/mL)
SueroP de cabra	2	-----	
AcP anti-ZAP-70	40	GAR-A647	20
AcM anti-Syk	50	GAM-Cy3	25
CTB-488	10	-----	-----

## APÉNDICE V ABREVIATURAS

A488, A647: fluorocromos Alexa que emiten fluorescencia a las longitudes de onda especificadas.

Ac: anticuerpo.

AcM: anticuerpo monoclonal.

AcP: anticuerpo policlonal.

ACR: Colegio Americano de Reumatología (del inglés *American College of Rheumatology*).

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNdc: ADN doble cadena.

AIRE: Factor de transcripción expresado en el timo que codifica la proteína *AIRE*. Promueve la transcripción de una amplia selección de genes específicos de proteínas que se expresan en los tejidos periféricos (del inglés *autoimmune regulator*).

Akt: (también conocida como PKB) proteína quinasa serina/treonina activada en células expuestas a diversos estímulos tales como hormonas, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular. Regula la función de muchas funciones celulares involucradas en procesos que incluyen metabolismo, apoptosis y proliferación (del inglés *protein kinase B*).

ANAs: antígenos antinucleares.

Anti-ADN: anticuerpo anti-ADN.

Anti-ADNdc: anticuerpo anti-ADNdc.

Anti-CD28: anticuerpo anti-CD28.

Anti-CD3: anticuerpo anti-CD3.

Anti-Sm: Anticuerpos contra proteínas no histonas asociadas al ARN. Son específicos de LES y deben su nombre al apellido del paciente en quien se describió por primera vez (del inglés *anti-Smith antibody*).

AP-1, AP-3: Factores de transcripción formados por las proteínas citoplasmáticas c-fos y c-jun (del inglés *Activator Protein 1* y *Activator Protein 3*, respectivamente).

ASB: albúmina sérica bovina.

ATP: adenosin trifosfato (del inglés *adenosine triphosphate*).

BFS: buffer fosfato salino.

BL: balsas lipídicas.

Blk: proteína tirosina quinasa implicada en el desarrollo, diferenciación y señalización de linfocitos B (del inglés *B lymphocyte kinase*).

BTS: buffer tris salino (del inglés *tris-buffered saline*).

Ca<sup>2+</sup>: calcio.

Cbl: proteína adaptadora que funciona como reguladora negativa de muchas vías de señalización que se disparan por activación de receptores de superficie celular (del inglés *Casitas B-lineage Lymphoma*).

CD25: grupo de diferenciación 25 (del inglés *cluster of differentiation 25*). Subunidad  $\alpha$  de alta afinidad del receptor para la IL-2.

CD28: grupo de diferenciación 28 (del inglés *cluster of differentiation 28*). Coreceptor de LT que se asocia a las moléculas B7 de la célula presentadora de antígeno.

CD3: grupo de diferenciación 3 (del inglés *cluster of differentiation 3*). Complejo molecular asociado físicamente al TCR que funciona como transmisor de señales luego del ligado del antígeno.

CD4: grupo de diferenciación 4 (del inglés *cluster of differentiation 4*). Coreceptor de linfocitos T cooperadores.

CD45: grupo de diferenciación 45 (del inglés *cluster of differentiation 45*). PTP que regula positiva y negativamente a diversas PTKs como Lck y Fyn.

CD8: grupo de diferenciación 8 (del inglés *cluster of differentiation 8*). Coreceptor de linfocitos T citotóxicos.

CDC42: proteína GTPasa pequeña de la familia *Rho*, la cual regula vías de señalización que controla diversas funciones celulares incluyendo morfología celular, migración, endocitosis y progresión del ciclo celular (del inglés *cell division control protein 42 homolog*).

CMF: canal medio de fluorescencia.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

CPA: célula presentadora de antígeno.

Csk: quinasa tipo *src* COOH-terminal (del inglés *COOH-terminal src kinases*). Regula negativamente a las *src* quinasas.

c-SMAC: complejos supramoleculares de activación central (del inglés *central-SMAC*).

CTB: subunidad  $\beta$  de la toxina de cólera (del inglés *cholera toxin  $\beta$* ) que identifica al gangliósido GM1 enriquecido en las balsas lipídicas de membrana.

CTLA-4: coreceptor de linfocitos T que regula negativamente la señalización. Se une a los coreceptores B7 de la célula presentadora de antígeno (del inglés *cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*).

D: dentro de la sinapsis inmunológica.

DAG: diacilglicerol (del inglés *diacylglycerol*).

DO: Densidad óptica.

ERK: quinasa regulada por señal extracelular (del inglés *extracellular signal regulated kinase*).

ESM: error estándar de la media.

F: fuera de la sinapsis inmunitaria.

FcR $\gamma$ : receptor de la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG). Induce fagocitosis, degranulación y estimulación celular (del inglés *receptor Fc gamma*).

FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés *fluorescein isothiocyanate*).

Fyn o p59<sup>fyn</sup>: PTK de la familia de las *src* que se encuentra unida constitutivamente al complejo TCR/CD3.

GADS: proteína adaptadora que liga el complejo SLP-76/Sos o Vav con el TCR/CD3 en linfocitos T (del inglés *Grb2-related adaptor downstream of Shc*).

GAM: anticuerpo producido en cabra anti-Ig de ratón (del inglés *goat anti-mouse*).

GAR: anticuerpo producido en cabra anti-Ig de conejo (del inglés *goat anti-rabbit*).

GDP: guanosina difosfato (del inglés *guanosine diphosphate*).

GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina (del inglés *guanine nucleotide exchange factor*).

GM1: gangliósido enriquecido en las balsas lipídicas (del inglés *monosialo-tetrahexosyl-ganglioside*).

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés *granulocyte macrophage colony stimulating factor*).

GPI: glicosilfosfatidilinositol (del inglés *glycosylphosphatidylinositol*).

Grb2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (del inglés *growth factor receptor bound protein 2*).

GTP: guanosina trifosfato (del inglés *guanosine triphosphate*).

HRP: Peroxidasa de rábano (del inglés *horseradish peroxidase*).

IB: inmunoblot (del inglés *immunoblot*).

IFN $\gamma$ : interferón gamma (del inglés *interferon- $\gamma$* ).

Ig: inmunoglobulina (del inglés *immunoglobulin*).

IGEPAL: nonil fenoxipolietoxilanol. Detergente no iónico que se utiliza para el aislamiento de complejos de membrana funcionales.

IgG: una de las cinco clases de anticuerpos humorales. Es la inmunoglobulina más abundante del suero y es sintetizada por los LB en respuesta a invasión de bacterias, hongos y virus (del inglés *immunoglobulin G*).

IKK: proteína quinasa serina/treonina que juegan un rol esencial en la activación de NF- $\kappa$ B y la regulación de la respuesta inflamatoria a infecciones virales (del inglés *Inducible I kappa-B kinase*).

IL-2, IL-4, IL-6, IL-21: interleuquina 2, 4, 6 o 21.

IMF: intensidad media de fluorescencia.

IP<sub>3</sub>: 1,4,5-inositoltrifosfato (del inglés *inositol triphosphate*).

IP<sub>3</sub>K: 1,4,5-inositoltrifosfato 3-quinasa (del inglés *Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinases*).

IRAK1: es una proteína quinasa serina/treonina que desempeña un papel crítico en la iniciación de la respuesta innata contra patógenos extraños (del inglés *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*).

IRF5: proteína con diversas funciones tales como activación de interferon mediado por virus, modulación del crecimiento celular, diferenciación, apoptosis (del inglés *interferon regulatory factor 5*).

ITAMs: motivo de activación dependiente de tirosina presente en inmunoreceptores (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*).

Itk: PTK de la familia de las Tec que es fosforilada en tirosina y activada por p56<sup>lck</sup>. Induce la fosforilación en tirosina de PLC $\gamma$ 1, su translocación a la membrana y la activación de su subunidad catalítica (del inglés *interleukin-2-inducible T-cell kinase*).

kDa: unidad de medida de peso molecular de una proteína (del inglés *kilo-Daltons*).

LAT: enlazador para la activación de LT (del inglés *linker for activation of T cells*).

LB: linfocitos B.

Lck o p56<sup>lck</sup>: PTK de la familia *Src* que se une a las cadenas CD4 y CD8 en su región citoplasmática y a la cadena  $\beta$  del IL-2R (del inglés *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*).

LE: célula polimorfonuclear del lupus.

LES: lupus eritematoso sistémico.

LT: linfocitos T.

Lyn: proteína quinasa que transmite señales desde el receptor de superficie celular y juega un rol importante en la regulación de la respuesta inmune adaptativa e innata, hematopoyesis, respuesta a factores de crecimiento y citoquinas, etc; además es esencial en la regulación de la diferenciación, proliferación, supervivencia y apoptosis de células B (del inglés *Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase*).

MAPKs: proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés *mitogen-activated protein kinases*).

MEKK: proteína serina/treonina que es activada por la MAP quinasa quinasa (del inglés *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*).

MHC: complejo principal de histocompatibilidad (del inglés major histocompatibility complex).

NF-AT: factor de transcripción (del inglés *nuclear factor of activated T-cells*).

NF $\kappa$ B: factor de transcripción (del inglés *nuclear factor kappa B*).

NK: células asesinas naturales (del inglés *natural killers*).

OAS2: proteína involucrada en la respuesta inmune innata a infecciones virales (del inglés *2'-5'-oligoadenylate synthetase 2*).

OKT3: anticuerpo monoclonal anti-CD3 $\epsilon$  para la estimulación de linfocitos T (del inglés *Orthoclone OKT3* o *Muromonab-CD3*).

PFA: paraformaldehído (del inglés *paraformaldehyde*).

PI-3K: fosfoinositol 3-quinasa (del inglés *phosphoinositide 3-kinase*).

PIP<sub>2</sub>: fosfoinositol 4,5-bifosfato (del inglés *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*).

PIP<sub>3</sub>: fosfoinositol 3,4,5-trifosfato (del inglés *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*).

PKA y PKC: proteína quinasa A y C, respectivamente (del inglés *protein kinase*).

PLC $\gamma$ 1: fosfolipasa C gamma 1. La PLC $\gamma$ 1 activada desdobla el fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) produciendo 1,4,5-Inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (del inglés *phosphoinositide-specific phospholipase C- $\gamma$  1*).

PMA: acetato de forbol miristato (del inglés *phorbol 12-myristate 13-acetate*).

PP2A: enzima tetramérica que participa en muchos aspectos de la función celular incluyendo la regulación de enzimas metabólicas y de proteínas involucradas en la transducción de señales (del inglés *protein phosphatase 2*).

p-SMAC: complejos supramoleculares de activación periférico (del inglés *peripheral-SMAC*).

PTK: proteína tirosina quinasa (del inglés *protein tyrosine kinase*).

PTPs: proteína tirosina fosfatasa (del inglés *protein tyrosine phosphatase*).

PVDF: fluoruro de polivinilideno (del inglés *poly-1,1-difluoroethene*).

Rac: es una subfamilia de las GTPasas de la familia *Rho*. Son proteínas G pequeñas de señalización, implicadas en la organización del citoesqueleto, migración celular, transcripción genética y proliferación celular (del inglés *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*).

Raf: proteínas que pertenecen a la familia de proteínas G pequeñas con propiedad de GTPasas que intervienen en el proceso de activación del linfocito T. Se caracterizan por activar quinasas específicas serina / treonina de la familia MAPK (del inglés *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*).

Ras o p21<sup>ras</sup>: proteína G pequeña conformada por una cadena similar al de las proteínas G heterotrimericas. Su forma activa enlaza GTP y su forma inactiva GDP (del inglés *reticular activating systemic*).

Ras-GDP o Ras-GTP: proteína Ras unida a GDP o GTP, respectivamente.

rpm: radianes por minuto.

RPMI: medio celular usado para cultivos celulares, enriquecido en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*).

Rr: coeficiente de Pearson. Medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

SFB: suero fetal bovino.

SH2: región de homología *src* que contiene múltiples residuos tirosina (del inglés *src homology 2 domain*).

Shc: proteína adaptadora que une al complejo Grb2-Sos al complejo TCR/CD3 (del inglés *src homology and collagen containing protein*).

SHP-1: PTP que regula negativamente la cascada de señalización intracelular (del inglés *src-homology phosphatase type 1*).

SI: sinapsis inmunológica. Región de contacto entre la célula presentadora de antígeno (CPA) y el linfocito T (LT), donde confluyen moléculas señalizadoras.

SLEDAI: índice de actividad del LES (del inglés *systemic lupus erythematosus disease activity index*).

SLP-65: proteína de leucocitos con dominio SH2 de PM 65 KDa (del inglés *SH2-domain-containing leukocyte protein of 65 KDa*).

SLP-76: proteína de leucocitos con dominio SH2 de PM 76 KDa (del inglés *SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 KDa*).

SMAC: grupos de activación supramoleculares (del inglés *supramolecular activation clusters*).

SNPs: polimorfismos de nucleótido simple (del inglés *single nucleotide polymorphisms*).

Sos: proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina para la molécula p21<sup>ras</sup> (del inglés *son of sevenless*).

Src: La familia Src de proteínas no receptores con actividad de tirosina quinasa desempeña papeles fundamentales en gran variedad de vías de transducción de señales, regulando procesos como la división celular, motilidad, adhesión, angiogénesis y sobrevivencia (del inglés *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*).

Syk: tirosina quinasa del bazo con PM de 72 KDa (del inglés *spleen tyrosine kinase*).

T CD4<sup>+</sup>: LT cooperadores (del inglés *Th cells*).

T CD8<sup>+</sup>: LT citotóxicos (del inglés *Tc cells*).

TCR: receptor de LT para el antígeno (del inglés *T cell receptor*).

Th1: subtipo de LT cooperadoras, efectoras de la inmunidad contra bacterias intracelulares y protozoarios (del inglés *helper T cells type 1*).

Th17: subtipo de célula T cooperadoras, efectoras de la inmunidad contra bacterias extracelulares y hongos (del inglés *helper T cells type 17*).

Th2: subtipo de célula T cooperadoras, efectoras de la inmunidad contra parásitos extracelulares (del inglés *helper T cells type 2*).

TLR: receptor tipo toll (del inglés *toll-like receptor*).

Treg: LT reguladores. Subpoblación de los LT, las cuales modulan el sistema inmunológico, manteniendo la tolerancia a antígenos propios (del inglés *regulatory T cell*).

TREX: complejo de multiproteínas que juega un rol en la expresión de la información genética (del inglés *transcription/export complex*).

Vav o p95<sup>vav</sup>: proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina para la molécula p21<sup>ras</sup> (del inglés *guanine nucleotide exchange factors for Rho family GTPases*).

VDJ: segmentos de genes VDJ que codifican proteínas con papeles importantes en el sistema inmunitario. Dicha recombinación específica genera un repertorio diverso de receptores de linfocitos T (TCR) y moléculas de inmunoglobulinas (Ig) que son necesarios para el reconocimiento de diversos antígenos bacterianos, virales y de parásitos, así como de células tumorales.

ZAP-70: PTK asociada a la cadena  $\zeta$  del TCR con PM de 70 KDa (del inglés *zeta-associated protein of 70 KDa*).