



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

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

TÍTULO DEL TRABAJO:

*Análisis de la Regulación de NETosis Mediada por Ubicuitinación
en Pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado*

**MODALIDAD DE TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

Maestra en Ciencias Médicas

PRESENTA:

Ana Barrera Vargas

TUTORA:

Dra. Diana Gómez Martín
Departamento de Inmunología y Reumatología,
INCMNSZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Diana Gómez Martín, INCMNSZ
Dr. Jorge Alcocer Varela, INCMNSZ
Dr. Rubén Burgos Vargas, Hospital General de México
Dr. Gilberto Vargas Alarcón, INCICH
Dr. Gustavo Reyes Terán, INER

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD MX, NOVIEMBRE DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

	Página
Resumen	2
Marco teórico	3
Planteamiento del problema y justificación	8
Objetivo general	9
Material y métodos	10
Resultados	13
Discusión y conclusiones	26
Bibliografía	30

RESUMEN

Introducción

La formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés) ha sido recientemente asociada a la fisiopatología del lupus eritematoso generalizado (LEG). Esto se debe principalmente al hecho de que la NETosis favorece la presencia de antígenos nucleares en el medio extracelular. Se han descrito modificaciones postraduccionales (MPT) en los componentes de las NETs. La ubiquitinación es una MPT, cuyas alteraciones han asociado a defectos en la tolerancia periférica en pacientes con LEG. Además, recientemente se ha descrito el papel que tiene la ubiquitina extracelular y su señalización a través de CXCR4 en la regulación del sistema inmune.

Debido a que se ha demostrado que las NETs pueden sufrir MPT y a la relación de la ubiquitinación con la tolerancia periférica, es importante definir si hay ubiquitinación en las NETs de pacientes con LEG. Así, se podrán conocer las implicaciones que este proceso puede tener, no solo para su degradación, sino también para la regulación de diferentes componentes del sistema inmune.

Objetivo

Evaluar los mecanismos de regulación de NETs mediados por ubiquitinación y la respuesta inflamatoria relacionada a la internalización de NETs en pacientes con LEG en comparación con controles sanos.

Material y métodos

Se estudiaron 38 pacientes con LEG, que se encontraban en remisión o activos sin tratamiento inmunosupresor, y 38 controles sanos, ajustados por edad y género. De cada sujeto se aislaron neutrófilos y se estimuló la formación de NETs. Se analizó la presencia de proteínas ubiquitinadas en las NETs por Western Blot, ELISA e inmunofluorescencia. Además, se realizó inmunoprecipitación para definir las proteínas ubiquitinadas en las NETs. Se aislaron macrófagos derivados de monocitos de pacientes con LEG y controles y se estimularon con NETs y con ubiquitina, así como con un inhibidor de CXCR4. Se midió el flujo de calcio y la síntesis de citocinas tras dichos estímulos.

Resultados

De los 38 pacientes estudiados, la mayoría eran mujeres (89.4%), con un promedio de edad de 30.3 ± 8.77 años. El índice de actividad promedio (SLEDAI) fue de 17.97 ± 8.9 . Se determinó la presencia de ubiquitina en las NETs de pacientes con LEG y controles sanos. Se encontró una mayor expresión de proteínas poliubiquitinadas en controles sanos que en pacientes con LEG. Por medio de inmunoprecipitación, se determinó que la mieloperoxidasa (MPO) de las NETs está ubiquitinada. Se determinó la presencia de anticuerpos anti-MPO ubiquitinada (anti-MPO-Ub) en pacientes con LEG, cuyos títulos correlacionaron positivamente con el SLEDAI ($r = 0.44$, $p < 0.01$), y negativamente con las fracciones de complemento (C3: $r = -0.428$, $p < 0.01$; C4: $r = -0.432$, $p < 0.01$). Al estimular macrófagos con NETs y con ubiquitina, se observó aumento en el flujo de calcio, que disminuyó al agregar un inhibidor de CXCR4. Finalmente, se encontró una mayor síntesis de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) en macrófagos de pacientes con LEG que provenientes de controles sanos, después de la estimulación con NETs.

Conclusión

Nuestros datos demuestran que existen proteínas poliubiquitinadas en las NETs, incluyendo MPO, con diferencias cuantitativas en los patrones de ubiquitinación entre pacientes con LEG y controles. Los pacientes con LEG presentan anticuerpos anti-MPO-Ub, que correlacionan con variables de actividad de la enfermedad. Por otro lado, la ubiquitina presente en las NETs ocasiona un aumento del flujo de calcio en los macrófagos y el estímulo con NETs favorece la síntesis de citocinas por estas células. Estos procesos, involucrados en la degradación, así como el perfil de ubiquitinación de las NETs, podrían contribuir a su papel proinflamatorio en pacientes con LEG y formar parte de la fisiopatogenia de la enfermedad.

MARCO TEÓRICO

NETosis. Generalidades

Los neutrófilos constituyen la población más abundante de leucocitos en sangre periférica y son un componente crucial en la primera línea de defensa contra microorganismos. En 2004, se describió la formación de NETs (trampas extracelulares de los neutrófilos, por sus siglas en inglés), las cuales son estructuras extracelulares en forma de malla conformadas tanto por componentes nucleares como por gránulos antimicrobianos. Las NETs son filamentos de cromatina que contienen proteínas de gránulos primarios (elastasa de neutrófilos, catepsina G, mieloperoxidasa), secundarios (catelicidina o LL-37, lactoferrina) y terciarios; el DNA y las histonas son sus mayores componentes. El proceso de su formación (o NETosis), en el cual son externalizadas por los neutrófilos, constituye un nuevo mecanismo de muerte de dichas células [1, 2]. La NETosis tiene un papel importante en la inmunidad contra diferentes clases de microorganismos [3, 4]. Por otro lado, desde el punto de vista patológico, la NETosis puede jugar un papel importante en el desarrollo de patologías autoinmunes. El hecho de que se favorezca la presencia de DNA extracelular por mecanismos diferentes a la apoptosis ha abierto nuevas posibilidades para comprender mejor los mecanismos que pueden asociarse a la pérdida de la tolerancia periférica [3].

Netosis en LEG

En el caso específico del lupus eritematoso generalizado (LEG), que es considerado el prototipo de las enfermedades autoinmunes sistémicas, se han descrito diversas anomalías en los neutrófilos que podrían asociarse a su patogénesis. Se ha reportado la existencia de una subpoblación de neutrófilos en sangre periférica de los pacientes con LEG que tienen una menor densidad y se co-purifican con células mononucleares de sangre periférica durante la sedimentación de la sangre. Estos granulocitos de baja densidad (LDG por sus siglas en inglés) se han asociado con daño endotelial y promueven una diferenciación endotelial anormal, por lo que podrían jugar un importante papel en la aterosclerosis acelerada del LEG. Además, muestran alteraciones en su capacidad fagocítica y se caracterizan por sintetizar niveles elevados de interferón tipo I, el cual ha sido documentado como un elemento relevante dentro del esquema fisiopatológico del LEG [5].

Recientemente se ha descrito una NETosis aberrante en LEG. En primer lugar, se han encontrado alteraciones en su degradación. Dado que los pacientes con LEG producen anticuerpos contra la cromatina y antígenos de neutrófilos, que son componentes de las NETs, una eliminación oportuna de las NETs puede ser crucial para mantener la homeostasis y evitar la presentación de autoantígenos. Se ha demostrado la importancia de la DNasa 1 como mecanismo de degradación de las NETs y su actividad se ha reportado como disminuida en LEG. Además, el mismo grupo de investigadores encontró que un subgrupo de pacientes con LEG (36.1%) muestra degradación ineficiente de las NETs. Una de las causas que encontraron fue la presencia de inhibidores de la DNasa 1. Además, al depletar el suero de anticuerpos IgA e IgG, encontraron que había mayor degradación, concluyendo que dichos hallazgos se asociaban a la existencia de anticuerpos que protegían a las NETs de dicha endonucleasa. Sin embargo, cabe destacar que en este trabajo no se comprobó la especificidad de estos anticuerpos. Las alteraciones en la eliminación de las NETs correlacionaron con la presencia de anticuerpos antiDNA y nefritis [6]. Asimismo, se ha visto que los pacientes con LEG activo e hipocomplementemia muestran una mayor

deficiencia en la degradación de las NETs, así como activación del complemento *in vitro* por medio de las NETs [7].

Además de la DNasa, se ha demostrado que los macrófagos también participan en la degradación de las NETs. El mismo grupo de investigación encontró que C1q puede opsonizar las NETs y facilitar su internalización por medio de los macrófagos. El proceso de degradación no se asoció con síntesis de citocinas al estudiar macrófagos de controles sanos [8]. Todo esto cobra una especial importancia en LEG, ya que se han descrito alteraciones en la capacidad de los fagocitos para depurar ciertos autoantígenos [9] y la deficiencia de C1q, aunque muy rara, se considera el mayor factor de riesgo genético para desarrollar la enfermedad [10].

No solo existen alteraciones en la degradación, sino que también se ha encontrado incremento en la frecuencia de NETosis en los pacientes con LEG y que los granulocitos de baja densidad son especialmente propensos a liberar NETs espontáneamente y contribuyen a la externalización de IL-17 en las NETs [11]. Los autoanticuerpos (específicamente anti-RNP) presentes en los pacientes con LEG pueden favorecer la NETosis, lo cual es específico de los neutrófilos de LEG, puesto que no se documentó en neutrófilos de controles sanos, sugiriendo un papel patogénico. Por otro lado, se ha demostrado que las NETs constituyen un estímulo para que las células dendríticas plasmacitoides liberen interferón tipo I [11-13]. Los pacientes con alteraciones en la degradación de NETs también tienen una mayor actividad de interferón tipo I [7]. Los trabajos previamente citados demuestran que un estímulo relevante para el incremento en la producción de interferón tipo I en pacientes con LEG proviene de las NETs.

Mieloperoxidasa y su papel en la inflamación

La mieloperoxidasa (MPO) es la proteína principal de los gránulos de los neutrófilos y un importante componente de las NETs. Esta molécula tiene diferentes efectos, en ocasiones contrastantes, en el sistema inmune. Por un lado, a través de la formación de agentes oxidantes, puede contribuir a la inflamación y fibrosis. También tiene función como autoantígeno, específicamente en vasculitis asociadas a ANCA, donde se encuentran anticuerpos anti-MPO. Por otro lado, se ha encontrado que puede ejercer una actividad supresora sobre el sistema inmune adaptativo, principalmente al afectar la función de las células dendríticas y la inducción subsecuente de la inmunidad adaptativa [14].

El papel de MPO en LEG es controversial. Se han encontrado niveles elevados de MPO en el plasma de pacientes con LEG [15]. Además, siendo un componente fundamental de las NETs, se ha sugerido que puede contribuir al daño a diferentes niveles, como la nefritis y aterosclerosis [11, 15]. Sin embargo, en un modelo murino de lupus inducido por pristano, se encontró que la deficiencia de MPO ocasionaba un daño renal más grave, además de una mayor acumulación de células T CD4⁺, macrófagos y neutrófilos a nivel glomerular. Además, en dichos ratones se observó un aumento en la activación de células dendríticas y células CD4⁺ en los órganos linfoides secundarios [16].

Modificaciones postraduccionales asociadas a NETosis y su asociación con LEG

Las modificaciones postraduccionales (MPT) son alteraciones químicas de una proteína que se presentan al agregar un grupo bioquímico funcional, el cual cambia la naturaleza química de un aminoácido o altera la estructura secundaria del polipéptido. Estas modificaciones se encargan de

diferentes funciones, como el desenrollamiento de cromatina, señalización, reconocimiento y comunicación intercelular y activación o desactivación enzimática. Se ha demostrado que las MPT de ciertos autoantígenos pueden contribuir a la fisiopatología de algunas enfermedades autoinmunes, lo cual también a su vez también podría tener relación con la NETosis [2].

En el caso del LEG, la mayoría de los autoantígenos relacionados con la enfermedad contienen DNA o RNA asociados a algún componente proteico que puede ser blanco de MPT [17]. Un ejemplo son los anticuerpos anti-histonas, cuya prevalencia en pacientes con LEG ha sido muy variable en distintos estudios, desde 17 hasta 95%, con un promedio de 40-60% [18]. Las histonas, que son un componente fundamental de las NETs, pueden sufrir diferentes MPT. Una de las principales modificaciones que sufren las histonas de las NETs es citrulinación, por medio de la familia enzimática PAD (peptidil arginina deiminasa). Incluso, se ha demostrado que la citrulinación de las histonas a través de PAD-4 es un marcador de la NETosis y es necesaria para la formación de NETs [19]. En un modelo murino de lupus, al utilizar Cl-amidina (inhibidor de PAD), se bloqueó la formación de NETs y disminuyó el daño a tejidos, incluyendo un menor depósito glomerular de autoanticuerpos [20]. Además de la citrulinación, se ha demostrado que las histonas de las NETs pueden tener otras MPT; también pueden ser acetiladas y metiladas. Sin embargo, en un estudio que utilizó suero de pacientes con LEG no todas las MPT de las histonas en las NETs coincidieron con aquéllas a las que se presentó autorreactividad en el suero estudiado [21]. Se considera que las MPT de las NETs pueden ser un mecanismo por el cual se expresen autoantígenos modificados, lo cual puede ser un mecanismo que favorezca la ruptura de los mecanismos de tolerancia periférica y el desarrollo y/o perpetuación de patologías autoinmunes.

Ubiquitinación y regulación de la respuesta inmune

La ubiquitinación es un proceso de modificación postraduccional que consiste en unir ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos, a un sustrato proteico. Hay una serie de reacciones secuenciales que median la conjugación de la ubiquitina. Esto incluye por lo menos tres pasos. Primero el residuo carboxi-terminal de glicina de la ubiquitina es activado por la enzima activadora de ubiquitina (E1), formando una unión de tioéster de alta energía entre el residuo de glicina de la ubiquitina y el residuo de cisteína del sitio activo de E1. Después, la ubiquitina activada es transferida al residuo de cisteína de una enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Por último, el complejo ubiquitina-E2 es reclutado a una tercera enzima, una ligasa de ubiquitina (E3), que se une a un sustrato proteico específico y facilita la transferencia de la ubiquitina activada de E2 a un residuo de lisina en el sustrato [22, 23].

Un sustrato puede unir una sola molécula de ubiquitina (monoubiquitinación) o puede formarse una cadena después de la conjugación de una molécula de ubiquitina (poliubiquitinación). La conjugación a ubiquitina es un proceso reversible y esta molécula puede ser separada de sus sustratos por medio de enzimas de deubiquitinación. Los diferentes tipos de cadenas de ubiquitina tienen distintos efectos en el sustrato. Aunque inicialmente se consideraba que la ubiquitina únicamente implicaba degradación, ya que dirigía la proteína marcada al proteosoma, recientemente se ha demostrado que la ubiquitinación tiene impacto en muchos procesos celulares, como la modificación de las funciones proteicas y control de la transcripción génica. En general, la poliubiquitinación está relacionada con el proteosoma y lleva a la destrucción de la proteína, mientras que cuando una proteína es monoubiquitinada puede jugar diversos papeles en la función celular. La posición del residuo de lisina que es ubiquitinado también influye en el

tipo de respuesta y función que tendrá la proteína modificada [22-24]. Específicamente, la poliubiquitinación a través del residuo de lisina 48 tiene mayor relación con el proteosoma, mientras que si ésta se lleva a cabo a través de la lisina en posición 63, tiene funciones relacionadas con la señalización, respuesta a daño del DNA y con otras diferentes funciones del sistema inmune [25].

En los últimos años se han descrito diversas funciones que juega la ubiquitinación en el sistema inmune. La degradación proteolítica de moléculas de señalización puede proveer un mecanismo poderoso para atenuar una señal de activación intracelular. También puede ser un mecanismo para eliminar los componentes inhibitorios de una molécula de señalización, como es el caso de NFκB. Por lo tanto, la degradación en el proteosoma dependiente de la poliubiquitinación constituye un mecanismo para regular las proteínas de señalización. Además, se ha visto que la ubiquitina participa en el control de la tolerancia, la diferenciación de las células T y la transducción de señales intracelulares [22].

La ubiquitinación participa en la tolerancia de las células T de diferentes maneras. Específicamente, las ligasas de ubiquitina, tales como las de la familia RING, están relacionadas con estos procesos. Mientras que c-Cbl es importante para mantener la tolerancia central, Cbl-b participa en la tolerancia periférica [23]. Su importancia se ha demostrado tanto en modelos murinos como en estudios con células humanas. En primer lugar, los ratones *cbl-b*^{-/-} tienen alta susceptibilidad a enfermedades autoinmunes y muestran un fenotipo similar al lupus eritematoso [26-28]. La ausencia de Cbl-b se traduce en un aumento en la proliferación de las células T, así como de la producción de IL-2, aún sin coestimulación por CD28 [27, 28]. Además, las células T deficientes en Cbl-b son resistentes a la anergia en respuesta a ionomicina o exposición a TGF-β. Incluso, las células T efectoras de ratones *cbl-b*^{-/-} tienen resistencia a la regulación por parte de las células T reguladoras, aunque estas últimas tengan una función adecuada [29, 30].

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha descrito la existencia de múltiples alteraciones en los mecanismos de tolerancia periférica en pacientes con LEG, particularmente la presencia del fenómeno de resistencia a anergia, lo cual se asoció a un defecto en la expresión de Cbl-b en las células T CD4 de estos pacientes. Al transfectar las células con un vector para sobre-expresar Cbl-b, dicha resistencia disminuyó significativamente, lo cual sugiere que la sobreexpresión de Cbl-b podría rescatar el fenotipo resistente a anergia de las células T en pacientes con LEG y refuerza su papel en las alteraciones en la tolerancia [31].

Ubiquitina extracelular y CXCR4 como reguladores de la respuesta inmune

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que la ubiquitina en su forma extracelular es también de gran relevancia como regulador de la respuesta inmune mediada por receptores de señales de daño (DAMPs por sus siglas en inglés) [32]. Las concentraciones de ubiquitina extracelular en plasma y suero en humanos se han reportado <10 nM. Asimismo, se ha descrito su presencia en LCR, líquido bronquial y orina [33]. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que la ubiquitina extracelular proviene de una liberación pasiva proveniente del recambio celular (principalmente eritrocitos) y de la secreción activa de diversas células, principalmente células mononucleares periféricas, monocitos y linfocitos [34, 35]. La ubiquitina extracelular tiene diferentes funciones, tales como su acción bactericida

[36] y participación en la diferenciación, activación e inducción de apoptosis de granulocitos, monocitos y linfocitos [35].

Saini et al [37] mostraron mediante estudios de sobre-expresión y silenciamiento génico, así como ensayos de inhibición competitiva, que el receptor acoplado a proteínas G, CXCR4 es el receptor de superficie funcional para ubiquitina extracelular. Sin embargo, tiene menor afinidad (2 veces) que el otro ligando conocido como canónico, CCL12 (SDF-1 α). La unión de ubiquitina a CXCR4 correlaciona con el número de receptores expresados en la superficie celular. Se ha demostrado que la unión de ubiquitina extracelular a CXCR4 desencadena una cascada de señalización, con efectos dosis dependiente, dentro de los cuales se destacan el incremento de la liberación de calcio intracelular mediado por la activación de fosfolipasa C β (PLC β); disminución de los niveles de AMPc [37]; fosforilación de ERK-1/2, cinasa ribosomal 1 (RSK1) y Akt [38].

Se ha reportado que la señalización mediada por ubiquitina extracelular es capaz de regular la respuesta inmune mediante diversos mecanismos, dentro de los cuales se encuentran la inducción de apoptosis de células de hematopoyéticas, mediante la activación de caspasa-3 y la supresión de la proliferación mediada por la inducción de degradación proteosomal de STAT3 [34]. Además, la ubiquitina extracelular es capaz de regular la síntesis de diversas citocinas. Específicamente, inhibe la producción de TNF- α mediada por LPS en células mononucleares de sangre periférica [39]. Mediante un modelo animal de lesión por isquemia-reperfusión en ratas, se demostró que la ubiquitina extracelular indujo la síntesis de IL-4, IL-10 e IL-13, lo cual sugiere una respuesta anti-inflamatoria mediada por células Th2 [40].

En concordancia con sus efectos biológicos, se han reportado niveles séricos incrementados en diversas patologías humanas, tales como insuficiencia renal crónica terminal, diabetes mellitus tipo 2, cardiopatía isquémica, cirrosis hepática, sepsis y en LEG [32], aunque en este último caso la evidencia es controversial [33]. Los niveles incrementados de ubiquitina extracelular pueden constituir parte de una respuesta contrarreguladora ante el estado proinflamatorio de las patologías descritas. Sin embargo, lo anterior no ha sido evaluado a nivel de subpoblaciones celulares, clave de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa.

En LEG, tanto en el modelo murino como en humanos con la enfermedad, existen reportes contradictorios sobre la expresión de CXCR4 y CCL12. Algunos de ellos demuestran incremento en la expresión de CXCR4 en células mononucleares periféricas, así como linfocitos T y B, principalmente en subpoblaciones vírgenes y depósito de CCL12 a nivel renal, lo cual correlaciona con la presencia de nefritis lúpica [41, 42]. Sin embargo, otros autores, han reportado ya sea niveles disminuidos de CXCR4 en linfocitos B de pacientes con LEG o ausencia de cambio en la expresión en comparación con controles sanos [43, 44]. Estas diferencias pueden deberse a la heterogeneidad de pacientes incluidos en los estudios y a los métodos de detección de CXCR4.

En resumen, la NETosis se encuentra asociada a diversas enfermedades autoinmunes, incluyendo el LEG. Esto se debe principalmente a la exposición de autoantígenos, tanto nucleares como de los gránulos antimicrobianos, en el medio extracelular. La mieloperoxidasa, uno de los principales componentes de las NETs, parece tener un papel dual en el sistema inmune. En algunos pacientes con LEG se ha documentado una NETosis incrementada, así como deficiencias en su degradación. Además, se

ha demostrado que las NETs pueden sufrir modificaciones postraduccionales, algunas de las cuales constituyen la formación de autoantígenos que pueden relacionarse a respuestas autoinmunes patogénicas. La ubiquitinación está estrechamente relacionada con la regulación del sistema inmune y se ha demostrado el papel que tienen las ligasas de ubiquitina tipo RING, como Cbl-b, en la tolerancia periférica y específicamente en LEG. Asimismo, la evidencia actual sugiere que la ubiquitina que se encuentra en el medio extracelular, la cual señala a través de CXCR4, es capaz de regular la respuesta inmune contra señales de daño y puede tener un efecto sobre la inducción de diversas citocinas y la liberación de calcio intracelular, lo cual podría estar implicado en la modulación de NETs en pacientes con LEG. Por lo anterior, tanto la ubiquitina extracelular como el sistema de ubiquitinación intracelular pueden funcionar como reguladores clave de la NETosis en LEG, lo cual no ha sido evaluado previamente y constituye el objetivo del presente trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Dentro de la fisiopatología del LEG, considerado el prototipo de enfermedad autoinmune sistémica, existen diferentes mecanismos que llevan a alteraciones en la tolerancia periférica. Se ha estudiado la importancia que tienen distintos grupos celulares en la pérdida de tolerancia, incluyendo a los linfocitos B y T, las células dendríticas y, recientemente, se ha retomado el papel de los neutrófilos y, junto con éstos, el papel que pueden jugar las NETs.

La NETosis tiene como característica fundamental la presencia de autoantígenos nucleares e intracelulares en el medio extracelular, lo cual puede favorecer una ruptura en la tolerancia y desarrollo o perpetuación de respuestas autoinmunes patogénicas. Por ello, es importante que exista un adecuado balance entre su producción y el proceso de degradación e internalización. En pacientes con LEG se han encontrado deficiencias en la degradación de NETs, específicamente asociadas a la DNAsa. Sin embargo, no se conoce si la internalización por medio de macrófagos se encuentra alterada en LEG y si podría favorecer una respuesta proinflamatoria.

Por otro lado, se ha demostrado que las NETs pueden sufrir modificaciones postraduccionales (MPT), algunas de las cuales favorecen aún más la presencia de autoantígenos que puedan relacionarse al desarrollo de patología autoinmune, como pueden ser las histonas modificadas. La MPT más estudiada en NETs, y que se considera fundamental para su formación, es la citrulinación. Sin embargo, también se ha demostrado que las proteínas de las NETs pueden sufrir acetilación o metilación. La ubiquitinación, otro tipo de MPT, está estrechamente relacionada con la regulación del sistema inmune, así como con la degradación proteica a través del proteosoma. Además, se ha demostrado que ligasas de ubiquitina de la familia RING, como Cbl-b, participan en el mantenimiento de la tolerancia periférica y tiene un papel específico en LEG.

Por lo tanto, es importante definir si hay ubiquitinación en las NETs de los pacientes con LEG y las implicaciones que esto puede tener, no solo para su internalización y degradación, sino también para la regulación y función de diferentes componentes del sistema inmune.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Existen proteínas ubiquitinadas en las NETs? En caso de ser así, ¿existen diferencias en los patrones de ubiquitinación y las proteínas ubiquitinadas entre los pacientes con LEG y los controles sanos?
- ¿Existen diferencias en la internalización de las NETs regulada por ubiquitinación, así como una respuesta inflamatoria diferencial asociada a la internalización, entre los pacientes con LEG y los controles sanos?
- ¿Existen efectos intracelulares ejercidos por la ubiquitina de las NETs a través del receptor CXCR4 en los macrófagos?

HIPÓTESIS

- Existe un patrón diferencial de ubiquitinación entre los pacientes con LEG y los controles sanos.
- Existen alteraciones en la internalización de las NETs asociadas a defectos en la ubiquitinación, así como una respuesta proinflamatoria asociada a la internalización de NETs en pacientes con LEG.
- La ubiquitina de las NETs activará CXCR4 y tendrá un efecto proinflamatorio en los macrófagos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los mecanismos de regulación de las NETs mediados por ubiquitinación y la respuesta inflamatoria relacionada a la internalización de las NETs en pacientes con LEG en comparación con controles sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la ubiquitinación de las NETs de los pacientes con LEG y los controles sanos.
- Comparar proteínas ubiquitinadas en las NETs de los pacientes con LEG y los controles sanos.
- Evaluar la síntesis de citocinas asociada a la internalización de NETs por macrófagos.
- Valorar el efecto de la ubiquitina de las NETs y el receptor CXCR4 sobre los macrófagos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, comparativo.

Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes con LEG de 18 a 50 años de edad que acudieron al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Debían cumplir por lo menos cuatro criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología [45] para LEG y estar en remisión (SLEDAI= 0 puntos) o tener enfermedad activa (SLEDAI \geq 6) [46], sin tratamiento inmunosupresor en el mes previo a la toma de muestra. Se incluyeron controles ajustados por edad (\pm 5 años) y género.

Criterios de exclusión

Se excluyeron mujeres embarazadas, pacientes con VIH u otra inmunodeficiencia, pacientes trasplantados y pacientes con alguna otra enfermedad autoinmune (excepto síndrome de anticuerpos antifosfolípidos). Además, se excluyeron sujetos con infecciones en las últimas dos semanas previas a la toma de muestra. Los controles sanos con historia familiar de enfermedades autoinmunes, al igual que aquéllos que hubieran presentado un cuadro infeccioso en las dos semanas previas, fueron excluidos.

Tamaño de muestra

Se tomó a partir de los resultados publicados [6] en cuanto a la degradación de NETs en pacientes con LEG en comparación con controles sanos. Al momento actual no hay datos precisos sobre la internalización de NETs, por lo que se tomó como surrogado su degradación para el cálculo del tamaño de muestra. Se consideró una significancia a dos colas del 5% y un poder de 95% con una delta de 0.36.

$$N = \frac{2Ks^2}{\Delta^2} \quad N = \frac{2.66}{0.129} \quad N = 20.52 + 10\% = 23 \text{ sujetos por grupo}$$

Procedimientos del estudio

Se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica de todos los sujetos. Se registraron variables clínicas, demográficas y de laboratorio de todos los sujetos. En el caso de los pacientes con LEG, se calculó el índice de actividad SLEDAI y se midieron anticuerpos anti-DNAc por ELISA y las fracciones C3 y C4 del complemento por nefelometría.

1. Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica

Los neutrófilos se aislaron por medio de separación de gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque. Se aspiraron las capas superiores, dejando únicamente la inferior (eritrocitos y neutrófilos). Se utilizó Dextran 20% para precipitar los eritrocitos y separarlos de los neutrófilos. Para remover los eritrocitos residuales, se realizó lisis con solución salina hipotónica (0.2%). Después de centrifugar 10 min a 1600 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de cultivo RPMI, evaluándose en términos numéricos y de viabilidad con azul tripano.

Granulocitos de baja densidad: Para el aislamiento de granulocitos de baja densidad (LDG), se aislaron células mononucleares mediante gradiente de densidad y se realizó lisis de eritrocitos como se describió previamente. Posteriormente se agregó anticuerpo anti-CD10 para la purificación de LDG. A continuación, se agregaron perlas magnéticas anti-biotina y se purificaron los granulocitos de baja densidad mediante selección magnética positiva. Se verificó la pureza

mediante citometría de flujo multiparamétrica, identificando a los granulocitos de baja densidad como CD10⁺/CD15⁺/CD14^{lo}. [11, 47]

2. Inducción de NETs

Una vez aislados los neutrófilos y los granulocitos de baja densidad, se colocaron en placas de 24 pozos (2 millones de células por pozo). Se incubaron con medio de cultivo RPMI por una hora para la producción de NETs. En el caso de los neutrófilos de sujetos sanos, se realizó estímulo con lipopolisacárido (LPS, 1µg/ml). En el caso de pacientes con LEG, se obtuvieron NETs por medio de estímulo con LPS o sin otro estímulo (NETs espontáneas). En el caso de los granulocitos de baja densidad, únicamente se obtuvieron NETs espontáneas. Después de la incubación de una hora a 37°C, se aspiró el sobrenadante y se colocó una solución de RPMI con micronucleasa. Se realizó una segunda incubación de 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. Después se recuperó el lisado de las NETs, desechando el pellet obtenido, y se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

3. Cuantificación de NETs

Se cuantificó el DNA de las NETs mediante incubación con Sytox Green (0.2 mM). Se incubó por 90 minutos a 37°C en una placa de 96 pozos con fondo oscuro. Después se leyó a una fluorescencia de 485/528 nm.

4. Ensayos de detección de ubiquitinación en NETs mediante Western Blot

Se realizó Western Blot de las NETs al separar cantidades iguales de proteína (100-400 µg) a través de electroforesis en un gel de poliacrilamida (4-20%). Se realizó transferencia a membranas de PVDF o de nitrocelulosa. Se usaron anticuerpos anti-ubiquitina total, anti-K48 (para reconocer proteínas poliubiquitinadas a través de la lisina 48) y anti-K63 (para reconocer proteínas poliubiquitinadas a través de la lisina 63). Se emplearon anticuerpos secundarios correspondientes y se revelaron mediante quimioluminiscencia. Fueron analizados mediante un analizador de imágenes digital con cámara CCD fría (Chemidoc MP, Biorad) y fueron cuantificados mediante densitometría con el programa ImageLab (Biorad).

5. Inmunoprecipitación de NETs

Se realizó inmunoprecipitación para NETs en los lisados provenientes de las NETs (400 µg de proteína) con la técnica de microesferas magnéticas (Dynabeads, Invitrogen). Se utilizó anticuerpo anti-ubiquitina P4D1 (10 µg). Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación por método indirecto. Después fueron analizadas por Western Blot como se describió anteriormente para la búsqueda de potenciales sustratos conjugados a ubiquitina, como MPO (Dako).

6. Inmunofluorescencia / microscopia confocal

Una vez que se aislaron y contaron los neutrófilos (cantidad aproximada, 1.5 millones/ml), se sembraron en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina. Se incubaron con RPMI por 90 minutos para inducir la formación de NETs. Después se fijaron y refrigeraron a 4°C. Las células fijadas se lavaron con PBS, se bloquearon con gelatina porcina 0.2% y se incubaron con anti-elastasa humana (1:500) y anti-ubiquitina (1:250) a 37°C por 30 minutos. Después se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor por 37 minutos a 37°C. El DNA nuclear se detectó mediante tinción con Hoechst 33342 (1:100) por 10 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se analizaron al microscopio. Las células positivas para elastasa de neutrófilos y tinción nuclear se consideraron productoras de NETs. Las NETs han sido descritas como un área de fluorescencia brillante más grande que los neutrófilos, con una morfología característica. Por medio de

microscopia confocal (Nikon A1R+), se buscó co-localización de la ubiquitina con las NETs. Se analizó con Nikon NIS Elements v 4.5.

7. Detección de anticuerpos anti-MPO ubiquitinada

Se realizó mediante ELISA no comercial. Brevemente, se utilizó una molécula de MPO recombinante (R&D systems) y una molécula de MPO purificada de humano (Lee Biosolutions), a una concentración de 100 ng/ml. Se diluyeron en PBS + 10% de suero bovino fetal (SBF) y en una placa de 96 pozos, se cubrieron los pozos con 100 μ l de solución y se dejaron incubar por 12 horas. Después se realizaron lavados y bloqueo con PBS + SBF 10%. Se agregaron 100 μ l de los sueros de los sujetos a estudiar (5 μ l de suero en 500 μ l de PBS + SBF 10%). Se realizaron lavados y se añadió anticuerpo conjugado anti-IgG de humano (INOVA). Se dejó en incubación, se agregó el sustrato y se realizó la lectura a una absorbancia de 450 nm (lector Sunrise/Tecan). Los resultados fueron normalizados conforme a la concentración de anticuerpos anti MPO encontrada en el suero de controles sanos.

8. Evaluación de la síntesis de citocinas por macrófagos cultivados con NETs.

Se evaluaron los niveles de citocinas en sobrenadantes de macrófagos cultivados con NETs. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica por medio de gradiente de densidad. Después, por medio de separación positiva por columnas magnéticas, se obtuvieron las células CD14⁺. Se cultivaron un millón de células por pozo en placas de 24 pozos con RPMI/suero bovino fetal y se agregó M-CSF (50 ng/ml). Posteriormente, al documentarse morfológicamente la diferenciación a macrófagos, éstos se estimularon con 50 μ g de NETs de distintos pacientes con LEG (tanto espontáneas como estimuladas con LPS) por 6 horas. Se midió la producción de citocinas (IL-6, IL-10 BD y TNF- α) por ELISA (Becton Dickinson para IL-6 e IL-10, eBioscience TNF- α)

9. Ensayo de flujo de calcio

Se aislaron macrófagos derivados de monocitos de pacientes con LEG y controles como se describió anteriormente y se colocaron en placas de 96 pozos. Se estimularon con ubiquitina recombinante humana (1 μ g) o 50 μ g de NETs provenientes de controles sanos, pacientes con LEG y LDG. Además, en ciertas condiciones se agregó un inhibidor de CXCR4 (AMD 3100, 3.3 μ M). Se midió el flujo de calcio intracelular por medio del ensayo Fluo-4 NW Calcium Assay Kit (Invitrogen), con un lector de fluorescencia (Omega 3) a 494/516 nm.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados en términos de media y desviación estándar o mediana e intervalo intercuartilar, dependiendo de la distribución de la muestra. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante prueba t de Student para muestras independientes o muestras pareadas, según fue conveniente. Para medir correlación, se utilizó el coeficiente de Pearson o Spearman, según fuera conveniente. Se consideró como significancia estadística una $p < 0.05$. El análisis se realizó con apoyo del programa estadístico SPSS para Windows versión 19.0.

Consideraciones Éticas

La participación de los pacientes y controles fue voluntaria; cada individuo firmó una hoja de consentimiento informado. Los investigadores se apegaron a los preceptos de la Declaración de Helsinki. Asimismo, seguimos los lineamientos éticos en materia de investigación que señala la Norma Oficial Mexicana (NOM 166-SSA1-1997). El protocolo de investigación contó con aprobación por los comités de ética e investigación institucionales (Ref 1243).

RESULTADOS

Se incluyeron 38 pacientes con LEG y 38 controles sanos, ajustados por edad y género. La mayoría de las pacientes eran mujeres (89.4%), con un promedio de edad de 30.3 ± 8.77 años. Treinta y cinco de los pacientes incluidos tenían un SLEDAI mayor a 6. Las variables asociadas a LEG se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales características clínicas y serológicas de los pacientes con LEG

Característica	Media (\pm DE)
SLEDAI	17.97 ± 8.89
Anti-DNA _{dc} (mg/dl)	711.289 ± 1684.95
C3 (mg/dl)	50.14 ± 25.5
C4 (mg/dl)	10.85 ± 5.33

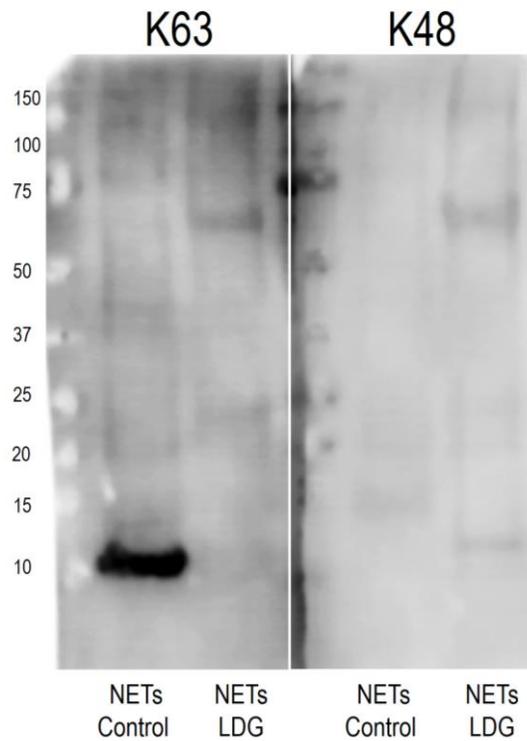
Se aislaron neutrófilos de todos los sujetos incluidos y se aislaron granulocitos de baja densidad de 15 pacientes con LEG. En todos los casos se indujo la producción de NETs.

1. Las NETs contienen proteínas ubiquitinadas

Se realizaron ensayos de Western Blot con NETs obtenidas de pacientes con LEG y controles, como se describe en Material y Métodos. Se encontró que había ubiquitina en las NETs. Además, encontramos proteínas ubiquitinadas, específicamente poliubiquitinadas, a través de la lisina 48 y la lisina 63, tanto en NETs de pacientes con LEG (provenientes de LDG y de neutrófilos convencionales) como en NETs de controles sanos (ver fig. 1). Además, se realizó inmunoprecipitación para ubiquitina total, encontrando patrones de ubiquitinación en las NETs tanto de pacientes, como de controles sanos. En un subgrupo de pacientes se utilizó MG132 (20 μ M), un inhibidor del proteosoma, durante la incubación de los neutrófilos para la formación de NETs, con la finalidad de aumentar la concentración de proteínas ubiquitinadas. Sin embargo, a esa concentración, no se observó un aumento en la cantidad de ubiquitina en las NETs obtenidas por este método.

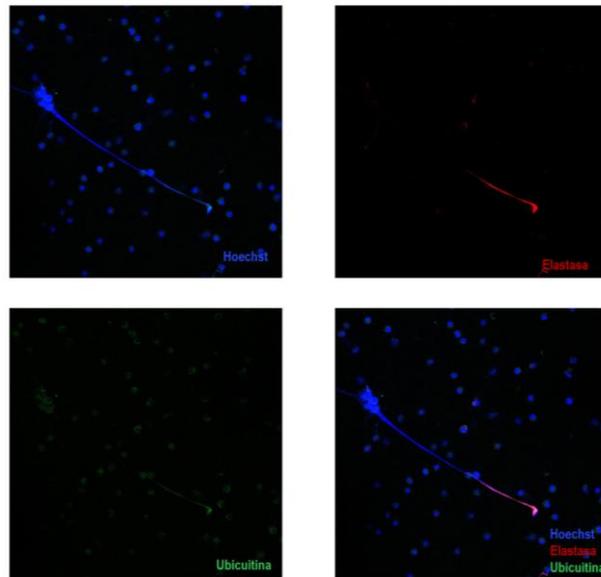
La presencia de ubiquitina en las NETs también fue demostrada por inmunofluorescencia, como se muestra en la figura 2.

Figura 1. Patrón diferencial de poliubiquitinación en NETs de pacientes con LEG.



En la figura se muestra la presencia de proteínas poliubiquitinadas en NETs. Brevemente, se aislaron neutrófilos de controles sanos y pacientes con LEG (tanto convencionales como granulocitos de baja densidad [LDG] en el caso de los pacientes con LEG) y se estimularon para la formación de NETs. Se obtuvieron las NETs y se analizó la expresión de proteínas poliubiquitinadas a través de las lisinas 48 (K48) y 63 (K63) por medio de Western Blot. Se muestran imágenes representativas de cada western blot para detección de K48 y K63 respectivamente.

Figura 2. Las NETs de los pacientes con LEG muestran la presencia de ubiquitina



Se aislaron neutrófilos de controles sanos y pacientes con LEG. Se colocaron en cubreobjetos (aproximadamente 1.5 millones células/ml) y se estimularon con LPS o únicamente con medio RPMI para la formación de NETs. Se realizó inmunofluorescencia con anti-elastasa (1:500), anti-ubiquitina (1:250) y Hoechst (1:100), así como anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor. Se analizó por medio de microscopia confocal. Las imágenes positivas para elastasa de neutrófilos y tinción nuclear, con morfología características, se clasificaron como NETs. Se muestra una imagen representativa en la que se observa colocalización de ubiquitina con los demás componentes de las NETs.

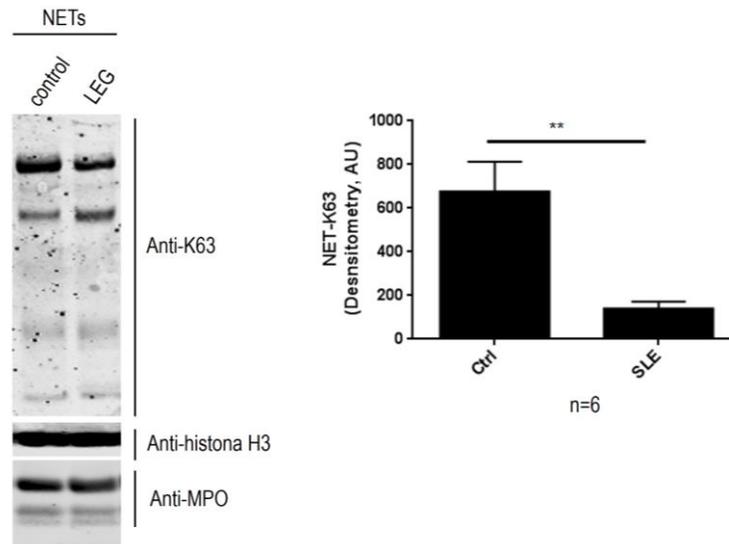
2. Existe un patrón diferencial de ubiquitinación entre pacientes con LEG y controles

Mediante Western Blot, se encontró un patrón diferencial de ubiquitinación entre pacientes con LEG y controles sanos. Además de documentarse múltiples bandas para proteínas ubiquitinadas en diferentes pesos moleculares, al cuantificar por densitometría, se encontró que había menor expresión de proteínas poliubiquitinadas a través de K63 ($p < 0.05$) en los pacientes con LEG en comparación con controles sanos, como se muestra en la figura 3A. También hubo una tendencia a menor expresión de proteínas poliubiquitinadas a través de K48 en las NETs provenientes de LEG vs controles sanos, pero dicha diferencia no alcanzó significancia estadística ($p = 0.072$, fig. 3B).

Para corroborar estos resultados, se realizó un ensayo de ELISA para ubiquitina. Al analizar NETs de controles, neutrófilos convencionales de pacientes con LEG y granulocitos de baja densidad de pacientes con LEG, se encontró una menor concentración de ubiquitina total en las NETs de los pacientes con LEG en comparación con los controles sanos ($p < 0.05$). De manera interesante, las NETs que tuvieron menor cantidad de ubiquitina fueron las de los granulocitos de baja densidad (ver fig. 4), sugiriendo que las NETs producidas por células con mayor capacidad proinflamatoria tienen menos proteínas ubiquitinadas, lo cual pudiera ser secundario a un efecto contra-regulatorio.

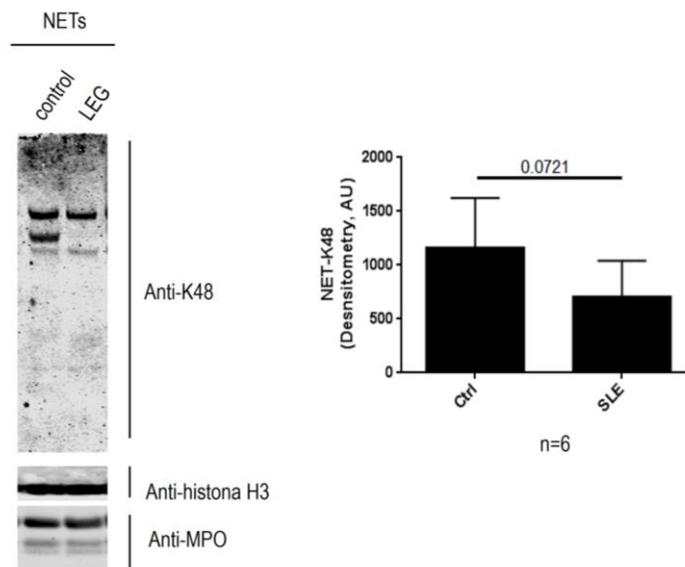
Figura 3. Las NETs de los pacientes con LEG muestran menor cantidad de proteínas poliubicitinadas a través de K63.

A. K63



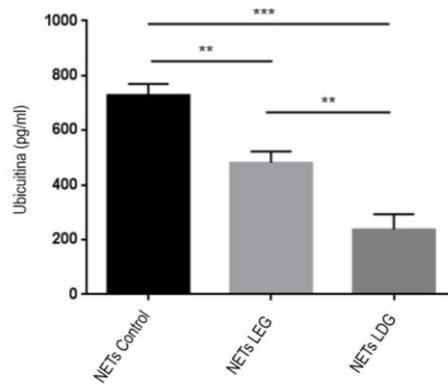
**p < 0.05

B. K48



Se aislaron neutrófilos de controles sanos y pacientes con LEG y se estimularon para la formación de NETs. Se obtuvieron las NETs y se analizó la expresión de proteínas poliubicitinadas a través de las lisinas 63 (a) y 48 (b) por medio de Western Blot. Se muestran figuras representativas que demuestran la diferencia entre patrones de ubiquitinación entre pacientes con LEG y controles. Además, se muestra la cuantificación por densitometría de 6 sujetos (expresada en media \pm EEM), observándose diferencias entre LEG y controles, con mayor expresión de proteínas ubiquitinadas en estos últimos.

Figura 4. Perfil cuantitativo diferencial de ubiquitina en NETs de pacientes con LEG y controles sanos



n= 5 sujetos por grupo
Media + EEM

Se aislaron neutrófilos (tanto convencionales como granulocitos de baja densidad [LDG] en el caso de los pacientes con LEG) de controles sanos y pacientes con LEG y se estimularon para la formación de NETs. Se obtuvieron las NETs y se analizó la expresión de proteínas poliubiquitinadas de 5 sujetos de cada grupo a través de ELISA. Las barras representan la media \pm EEM de la concentración de ubiquitina en las NETs de cada grupo de sujetos, demostrándose diferencia entre NETs de controles sanos, NETs de neutrófilos convencionales en pacientes con LEG y NETs de LDG.

**p<0.05

*** p<0.01

3. La mieloperoxidasa se encuentra ubiquitinada en las NETs y existen autoanticuerpos anti-MPO ubiquitinada en pacientes con LEG.

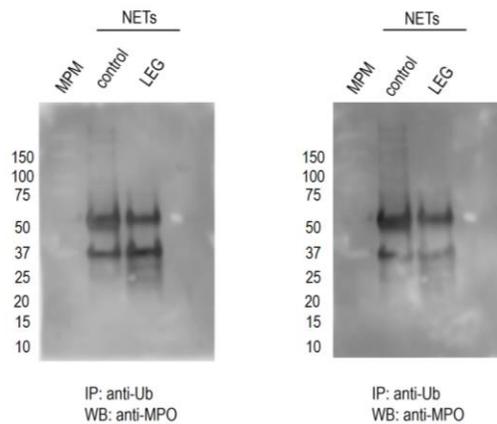
Después de comprobar la presencia de proteínas ubiquitinadas en las NETs, se buscaron componentes específicos de las NETs que estuvieran ubiquitinados. Se investigó dirigidamente la presencia de mieloperoxidasa ubiquitinada debido a su abundancia en las NETs, así como su papel antigénico en ciertas enfermedades autoinmunes. Por medio de inmunoprecipitación de NETs, se encontró que la MPO efectivamente se encuentra ubiquitinada (fig. 5).

Se comparó una proteína de MPO recombinante con una purificada de neutrófilos humanos, encontrando mediante Western Blot, la presencia de ubiquitina total y proteínas poliubiquitinadas en la proteína purificada (fig. 6).

Para determinar el potencial papel proinflamatorio de la MPO ubiquitinada (MPO-Ub), se realizó un ensayo de ELISA con suero de pacientes con LEG y controles. Se estudió el suero de 59 pacientes con LEG (los 38 pacientes incluidos y el resto se obtuvo de un banco de sueros) y 37 controles, encontrando mayor concentración de anticuerpos contra MPO-Ub en pacientes con LEG que en controles (2.14 vs 1.22, $p < 0.01$) (fig. 7). Además, al comparar los anticuerpos contra la proteína recombinante (MPO) y la proteína purificada (MPO-Ub), se encontró una mayor concentración contra esta última en pacientes con LEG (2.14 vs 1.87, $p < 0.01$).

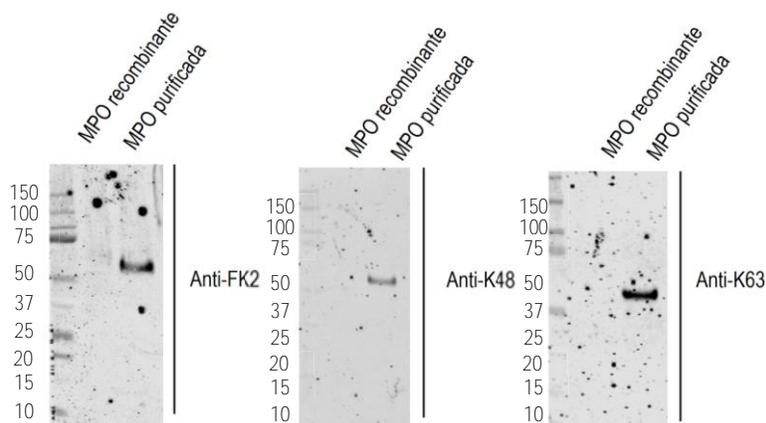
Al comparar los niveles de anticuerpos anti-MPO-Ub con variables clínicas y serológicas asociadas a LEG, se encontró una correlación positiva con el puntaje SLEDAI ($r = 0.44$, $p < 0.01$), así como una correlación negativa con las fracciones de complemento (C3: $r = -0.428$, $p < 0.01$; C4: $r = -0.432$, $p < 0.01$). No hubo correlación con los niveles de anticuerpos anti-DNAc.

Figura 5. Las NETs de pacientes con LEG contienen MPO ubiquitinada



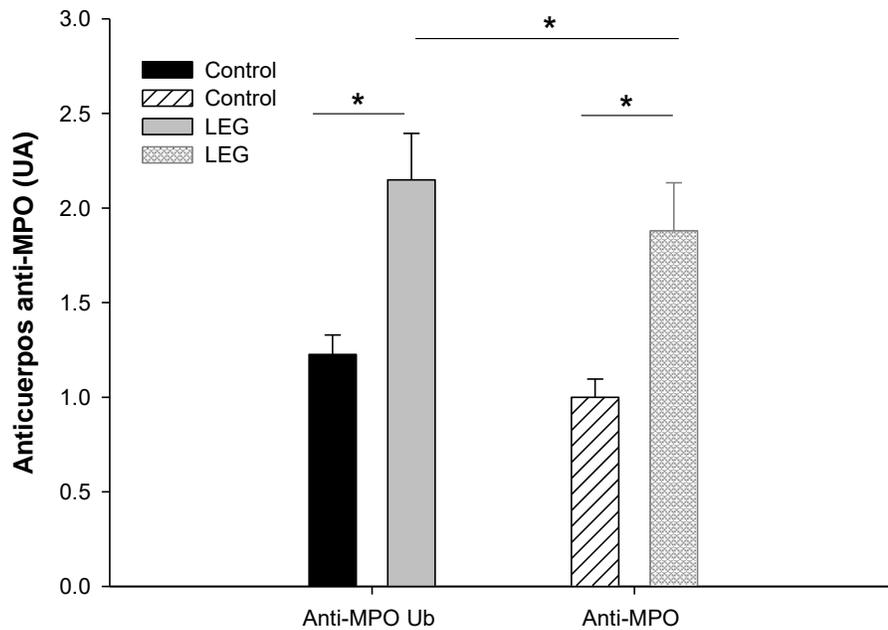
Se aislaron neutrófilos de controles sanos y pacientes con LEG y se estimularon para la formación de NETs. Se obtuvieron las NETs y se realizó inmunoprecipitación con anti-ubiquitina por medio de microesferas magnéticas. Después se realizó análisis por Western Blot, con anti-MPO. Se muestra la interacción entre MPO y ubiquitina.

Figura 6. MPO ubiquitinada a través de diferentes patrones de ubiquitinación



Se analizó mediante Western Blot la expresión de proteínas poliubiquitinadas en dos moléculas de MPO. La primera es recombinante (R&D systems) y la segunda es purificada de humano (LeeBiosolutions). Se analizó la expresión de proteínas mono y poliubiquitinadas (FK2), poliubiquitinación a través de lisina 48 (K48) y poliubiquitinación a través de la lisina 63 (K63). Se demuestra que la MPO purificada presenta tanto mono como poliubiquitinación, siendo esta última a través de K48 y K63. Se muestran imágenes representativas de cada Western Blot.

Figura 7. El suero de pacientes con LEG presenta anticuerpos anti-MPO ubicuitinada



* $p < 0.01$

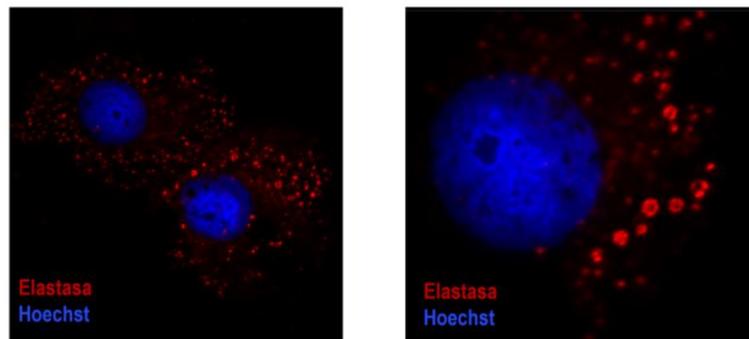
Se analizó la presencia de anticuerpos anti-MPO ubicuitinada (MPO Ub; MPO purificado de humano Lee Biosolutions) y MPO sin ubicuitina (MPO; MPO recombinante R&D Systems) por medio de ELISA no comercial. Se analizó el suero de 57 pacientes con LEG y 39 controles sanos. Las barras muestran los datos acumulados (media \pm EEM) de la cantidad de anticuerpos (unidades arbitrarias), normalizado para los anticuerpos anti-MPO en controles sanos. Se observan diferencias significativas entre la concentración de anticuerpos entre pacientes con LEG y controles, así como una mayor concentración de anticuerpos anti-MPO Ub en comparación con anti-MPO en pacientes con LEG.

4. Los macrófagos internalizan las NETs y tienen una respuesta proinflamatoria en pacientes con LEG.

Se aislaron macrófagos derivados de monocitos, tanto de controles sanos como de pacientes con LEG. Se incubaron por seis horas con NETs y, por medio de inmunofluorescencia, se determinó la internalización de elastasa (que no es expresada por macrófagos), como se describió en Material y Métodos (fig. 8).

Para determinar si la internalización de NETs por medio de macrófagos es un proceso proinflamatorio, se obtuvieron los sobrenadantes después de incubar macrófagos con NETs de 7 sujetos (LEG y controles). Se analizó la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 por medio de ELISA. Se encontró que, en el caso de TNF- α e IL-6, había una mayor producción por los macrófagos de pacientes con LEG cuando eran estimulados con NETs que habían sido generadas con el estímulo de LPS. En el caso de IL-10, la producción fue mayor tanto con NETs generadas de manera espontánea como con aquéllas generadas con LPS (fig. 9). Estos hallazgos sugieren que la internalización de NETs no es un proceso completamente silente, al menos en células provenientes de pacientes con LEG.

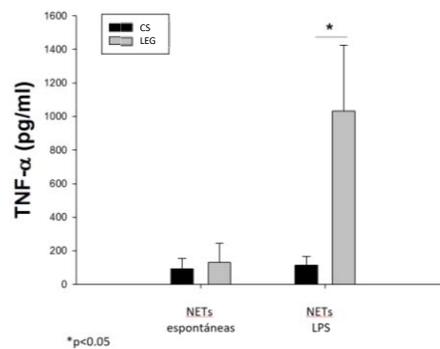
Figura 8. Los macrófagos derivados de monocitos internalizan elastasa proveniente de las NETs.



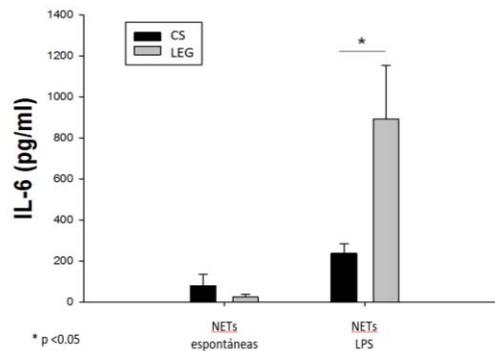
Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LEG y controles sanos. Después, por medio de separación positiva por columnas magnéticas, se obtuvieron las células CD14⁺ y se estimularon con M-CSF para la formación de macrófagos. Se estimularon 50 μ g de NETs de distintos pacientes con LEG por 6 horas. Se realizó inmunofluorescencia con anti-elastasa y Hoechst. Se analizó por medio de microscopia confocal. Se muestra una imagen representativa en donde se observa internalización de elastasa de las NETs por medio de los macrófagos.

Figura 9. Los macrófagos producen diversas citocinas en respuesta a la estimulación con NETs

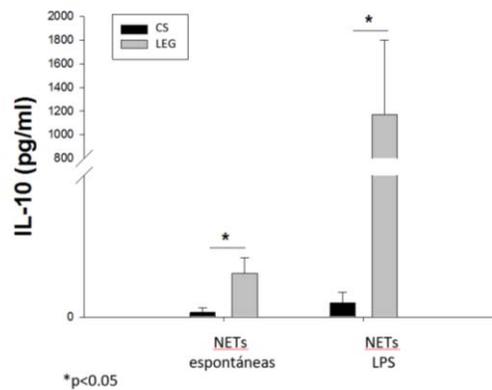
A. TNF- α



B. IL-6



C. IL-10



Se aislaron macrófagos derivados de monocitos de pacientes con LEG y controles sanos. Se estimularon con 50 μ g de NETs (tanto espontáneas como estimuladas por LPS) por 6 horas. Se obtuvieron los sobrenadantes y se midieron las concentraciones de TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) por ELISA. Las barras muestran los datos acumulados (media \pm EEM) de la concentración de cada citocina. Se encontró una mayor concentración de las tres citocinas al comparar macrófagos de pacientes con LEG con controles cuando las NETs fueron estimuladas con LPS. En el caso de IL-10 (C), la concentración fue mayor en macrófagos de LEG independientemente del estímulo utilizado para las NETs.

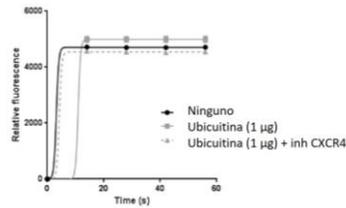
5. La ubiquitina extracelular, a través de la señalización de CXCR4, juega un papel en la activación macrofágica.

Debido a que la activación de CXCR4, receptor de ubiquitina extracelular, genera un aumento en el flujo de calcio a través de la fosfolipasa C β , se analizó el flujo de calcio en macrófagos después de diversos estímulos. Inicialmente, se estimuló con ubiquitina extracelular recombinante humana mostrando un aumento con respecto al flujo basal, lo cual disminuyó al agregar un inhibidor de CXCR4 (fig. 10A). Después, macrófagos de LEG y controles sanos fueron estimulados con NETs provenientes de controles, pacientes con LEG y granulocitos de baja densidad de pacientes con LEG. En todos los casos se observó aumento en el flujo de calcio después de la estimulación con NETs, el cual disminuyó al agregar un inhibidor de CXCR4 (fig. 10B y 10C). Al valorar la respuesta de macrófagos aislados de pacientes con LEG, se encontró un mayor flujo de calcio con las NETs derivadas de controles. El aumento menos significativo se observó con las NETs provenientes de granulocitos de baja densidad (fig. 10D). Estos hallazgos correlacionan con lo documentado mediante ELISA para ubiquitina en NETs.

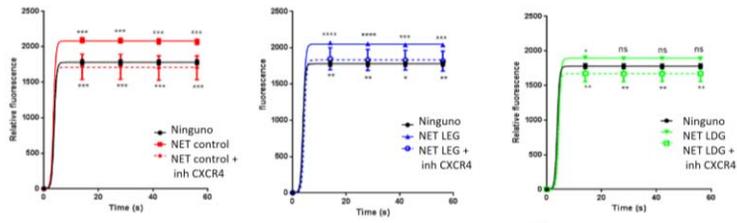
Al corroborar que la ubiquitina y las NETs favorecen un aumento en el flujo de calcio, se consideró la hipótesis de que la ubiquitina extracelular podría favorecer NETosis en neutrófilos adyacentes, ya que el aumento en los niveles de calcio intracelular es uno de los primeros mecanismos por los cuales se inicia dicho proceso. Sin embargo, los resultados de generación de NETs con estimulación con ubiquitina (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), así como inhibición de CXCR4 (AMD 100 50 μM), fueron poco consistentes. En algunos sujetos hubo una importante inducción de NETs al estimularlos con ubiquitina, pero esto no siempre fue replicado. Además, los resultados al agregar un inhibidor de CXCR4 fueron variables (tanto aumento como disminución en la producción de NETs).

Figura 10. Flujo de calcio en macrófagos en respuesta a ubiquitina y NETs

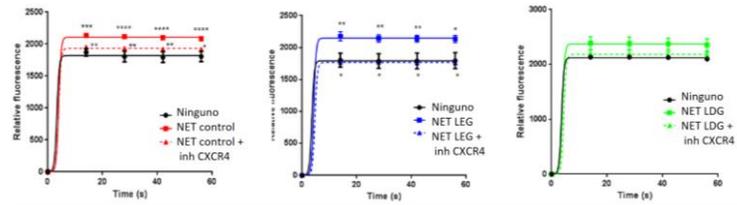
A. Respuesta a ubiquitina



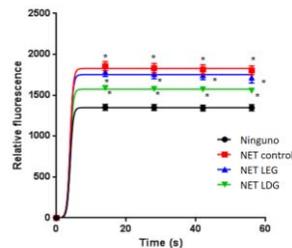
B. Macrófagos LEG con NETs e inhibidor de CXCR4



C. Macrófagos control NETs e inhibidor de CXCR4



D. Macrófagos LEG con NETs heterólogas



Se aislaron macrófagos derivados de monocitos de pacientes con LEG y controles sanos. Se estimularon con ubiquitina recombinante (A) o con 50 µg de NETs de controles, pacientes con LEG y LDG derivados de pacientes con LEG(B-D). Además, se utilizó un inhibidor de CXCR4, el receptor de ubiquitina extracelular (A-C). En todos los casos se midió el flujo de calcio por medio del ensayo Fluo-4 NW Calcium Assay Kit. Se observa un mayor flujo de calcio con ubiquitina (A) y con NETs (B-D), que disminuyó al agregar el inhibidor de CXCR4 en todos los casos. Además, se observó un flujo de calcio diferencial al agregar NETs de controles sanos, pacientes con LEG y LDG (D).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los últimos años, las NETs han cobrado especial relevancia en la fisiopatología de diversas enfermedades autoinmunes, incluyendo el LEG. Se han visto asociadas con diferentes manifestaciones de la enfermedad y sus componentes se han asociado con tipos específicos de daño. Por tal motivo, se han intentado caracterizar de manera más precisa dichos componentes y el papel que pueden jugar en distintos padecimientos inmunológicos. En este trabajo describimos por primera vez que existen proteínas ubiquitinadas en las NETs, así como la presencia de ubiquitinación de la molécula de mieloperoxidasa, uno de los principales componentes de estas trampas extracelulares.

Encontramos que existen proteínas poliubiquitinadas en las NETs, tanto a través de la lisina 48 como de la lisina 63. Esto podría tener implicaciones en diversas funciones de sistema inmune. La ubiquitinación a través de la lisina 63 está involucrada en distintos procesos celulares, como la reparación de DNA, la señalización a través de NF- κ B y la regulación del tránsito endosomal, todos los cuales tienen relación con la respuesta inmune. A diferencia de otras formas de poliubiquitinación, no tiene relación con la degradación proteica a través del proteosoma [25].

De manera interesante, encontramos una mayor ubiquitinación en NETs provenientes de neutrófilos de controles sanos que en NETs de pacientes con LEG. A su vez, las NETs provenientes de granulocitos de baja densidad fueron las que tuvieron menor expresión de proteínas ubiquitinadas. Esto podría tener relación con la menor expresión de ligasas de ubiquitina en LEG, como se demostró con Cbl-b en linfocitos T [31]. Por otro lado, existen resultados controversiales acerca de los niveles de ubiquitina en suero en pacientes con LEG, ya que se han encontrado resultados tanto elevados [32] como disminuidos [33], al compararlos con controles sanos.

En cuanto al efecto que podría tener esta expresión diferencial de ubiquitina en las NETs, existen diferentes posibilidades. Por un lado, la ubiquitina en su forma extracelular se ha relacionado con una respuesta predominantemente anti-inflamatoria y contrarreguladora en estados como sepsis [32, 40]. Por lo tanto, su mayor presencia en controles sanos podría constituir un mecanismo regulador de un estado proinflamatorio que conllevó a NETosis, el cual estaría ausente o deficiente en pacientes con LEG, y por lo tanto, la menor cantidad de ubiquitina en NETs de pacientes con LEG y particularmente en LDG sería un mecanismo que podría perpetuar la respuesta autoinmune patogénica en un estado proinflamatorio persistente. Sin embargo, no se puede descartar que la modificación que ocasione la ubiquitina en ciertos autoantígenos (como los que están presentes en las NETs), podría volverlos más inmunogénicos o que su señalización a través de CXCR4 [37] favorezca una respuesta inflamatoria.

Además, encontramos que MPO es una proteína que se encuentra ubiquitinada dentro las NETs. Como se mencionó anteriormente, MPO parece jugar un papel dual en inflamación y autoinmunidad. Específicamente en LEG se ha asociado a daño endotelial, favoreciendo aterosclerosis acelerada [15], y a nefritis, por el papel que juega en las NETs [6, 11]. Sin embargo, el hecho de que ratones deficientes en MPO hayan tenido una menor respuesta inflamatoria en el riñón, como encontraron Odobasic, et al pone en duda si su papel es únicamente proinflamatorio. Además, en ese mismo estudio no se encontraron anticuerpos anti-MPO en los ratones [16]. Otro hallazgo que parecería favorecer una respuesta anti-inflamatoria de MPO en LEG es el del Bouali et al [48], quienes encontraron que el polimorfismo G-463A

en el gen de MPO, que se asocia con una menor expresión de esta molécula, se asoció a nefritis lúpica en afroamericanos.

En contraste con lo reportado por dichos autores, en nuestros hallazgos, MPO actúa como una molécula inmunogénica, ya que encontramos más anticuerpos contra las dos formas de MPO en pacientes con LEG que en controles. Sin embargo, es importante considerar que el trabajo de Odobasic estudió un modelo murino *in vivo*, mientras nuestros hallazgos fueron con muestras de pacientes analizadas *in vitro*. Además, considerando que la existencia anticuerpos contra MPO ya ha sido demostrada en ciertos pacientes con nefritis lúpica por otros grupos [49, 50], una hipótesis sería que la ausencia o cantidades disminuidas de MPO prevendría la formación de dichos autoanticuerpos, favoreciendo una menor respuesta inflamatoria, en concordancia con los datos del modelo murino deficiente.

El otro hallazgo significativo es que los pacientes con LEG tuvieron una mayor concentración de anticuerpos contra MPO-Ub que contra MPO no conjugada con ubiquitina. Al respecto, se han propuesto hipótesis acerca del papel que puede jugar la ubiquitina como MPT y como proteína antigénica. Debido a que es una proteína altamente conservada y muy abundante en diversas especies, se considera que es poco propensa a desencadenar una respuesta inmune y que incluso podría proteger a sus sustratos del reconocimiento del sistema inmune [51]. Sin embargo, al esconder ciertos epítopes, existe la posibilidad de que podría exponer otros más inmunogénicos y más susceptibles a desencadenar una respuesta proinflamatoria. En este caso, las NETs de pacientes con LEG, que continuamente están exponiendo MPO-Ub, favorecerían la presencia de dichos autoanticuerpos.

De manera interesante, la presencia de anticuerpos anti-MPO no correlacionó con la presencia de otros autoanticuerpos (anti-DNAc), pero sí lo hizo con la actividad de la enfermedad y, de manera más importante, correlacionó negativamente con los niveles de complemento. Esto podría indicar que dichos anticuerpos tienen la capacidad de fijar complemento, favorecer su depósito en distintos tejidos (por ejemplo, a nivel renal), disminuyendo sus niveles séricos y desencadenando una reacción proinflamatoria. Esto sería diferente al papel en las vasculitis asociadas a ANCA, donde los anticuerpos anti-MPO se asocian a una glomerulonefritis pauci-inmune, sin depósito de complejos inmunes o complemento.

Finalmente, en relación a la MPO, la influencia que puede tener la ubiquitinación sobre dicha molécula y sus efectos sobre el sistema inmune aún está por definirse. La ubiquitinación podría estar involucrada en la función dual que se ha descrito sobre MPO en el sistema inmune [14], ya que las modificaciones ocasionadas por la ubiquitina en la conformación de la molécula podrían influir en su acción enzimática y en su función, tanto intracelular como cuando forma parte de las NETs. Además, esto podría tener efecto en su capacidad oxidativa. Para demostrar el papel fisiopatogénico que puede tener la MPO-Ub en LEG, se pueden estudiar sus efectos en la activación y proliferación de otras celulares (como células dendríticas y células T), sobre las cuales se ha observado un efecto supresor de la molécula de MPO [16]. Además, falta evaluar su efecto en los macrófagos, donde se demostró una respuesta diferencial a las NETs y a la ubiquitina, como se discutirá más adelante. Queda pendiente definir si estas interacciones se podrían ver afectadas por la ubiquitinación y si hay diferencias en la cantidad de MPO ubiquitinada entre pacientes con LEG y controles.

Además, será importante determinar si la ubiquitinación de la MPO tiene efectos en otras enfermedades, como vasculitis asociada a ANCA, donde tiene un importante papel como autoantígeno. No solo existen anticuerpos anti-MPO, pero a éstos se les ha encontrado un papel fisiopatológico, tanto en modelos murinos como en humanos [52, 53]. Un caso de vasculitis congénita en el recién nacido de una mujer con anticuerpos anti-MPO positivos, que fueron transferidos vía transplacentaria, claramente ilustra su importancia en el desarrollo de la enfermedad [54].

En relación al papel que podría jugar la ubiquitina en su forma extracelular (no unida a las proteínas de las NETs), encontramos un efecto de aumento del flujo de calcio en los macrófagos al estimularlos con ubiquitina libre. Esto parece ser mediado por CXCR4, ya que uno de los principales mecanismos de este receptor es justamente aumentar el calcio por su acción sobre la fosfolipasa C β [37]. Además, al inhibir CXCR4, el flujo de calcio disminuyó, en ocasiones por debajo del basal. De acuerdo con los resultados anteriores, cuando se estimuló a los macrófagos con NETs, el flujo de calcio fue mayor cuando éstas provenían de controles. Esto sugiere que la ubiquitina es un mediador de este aumento, ya que su concentración fue mayor en los controles que en los pacientes con LEG. A pesar de que se corroboró el aumento del flujo de calcio, no se determinó si la ubiquitina contenida finalmente tenía un papel proinflamatorio, por lo que será importante determinar si el hecho de que las NETs tengan más ubiquitina las vuelve más inmunogénicas. De hecho, los cambios podrían ser no solo relacionados a la cantidad de proteínas ubiquitinadas, sino también al tipo de proteínas que tuvieran dicha modificación.

Al estimular macrófagos de LEG con NETs se observó que éstas fueron internalizadas y, como respuesta, se documentó una importante síntesis de citocinas. Cuando se midieron TNF- α e IL-6, solo se observó una diferencia con los controles cuando el estímulo para formar las NETs fue LPS. Esto concuerda parcialmente con lo descrito por Farrera, et al [8], quienes encontraron que al estimular macrófagos tanto con NETs como con LPS, había una mayor síntesis de citocinas que al estimularlos únicamente con LPS. Una diferencia importante es que, en dicho estudio, los macrófagos fueron estimulados con NETs y LPS y en nuestro caso, los neutrófilos fueron estimulados con LPS para la producción de NETs, pero no fue una estimulación directa sobre los macrófagos. Por otro lado, nuestros resultados son similares a lo encontrado por Carvalheiro et al con suero de pacientes con LEG. Al estimular monocitos con suero de controles y pacientes con LEG, no observaron producción de TNF- α , pero al agregar LPS observaron una mayor producción de TNF- α al agregar el suero, y dicho aumento fue mayor cuando el suero provenía de pacientes activos y/o con títulos altos de anticuerpos anti-DNAc [55]. Lo observado con LPS en estos tres estudios probablemente sea secundario a un mecanismo de sinergia, que pudiera ser mediado por TLR4. Este receptor se ha visto involucrado en la fisiopatología del LEG, tanto en humanos como en modelos murinos [56]. El aumento en la expresión de TLR4 en monocitos de pacientes con LEG se asoció a nefritis [57]. Además, Zhang et al [58] describieron que los anticuerpos anti-DNA activan el inflammasoma NLRP3 a través de TLR4 en macrófagos de pacientes con LEG. Además, la estimulación junto con LPS podría ser más parecido a la respuesta convencional, ya que muchas veces las NETs se producen en respuesta a estímulos infecciosos.

En cuanto a la IL-10, su síntesis fue mayor en los dos casos (estímulo con NETs espontáneas o estímulo con NETs inducidas con LPS). Esto probablemente esté relacionado con el particular papel que juega la IL-10 en pacientes con LEG. Aunque tradicionalmente es considerada una citocina anti-

inflamatoria por su efecto sobre células T y macrófagos, se ha encontrado que en pacientes con LEG favorece la producción de autoanticuerpos a través de su acción sobre células B [59]. Considerando este punto, incluso podría estar relacionada con la producción de anticuerpos anti-MPO Ub en pacientes con LEG. Además, diversos grupos han documentado niveles elevados de IL-10 en pacientes con LEG [60, 61]. En un estudio longitudinal se consideró como un biomarcador potencial, ya que sus niveles elevados se asociaron a actividad de la enfermedad y sirvieron como predictores [62]. Incluso, un ensayo clínico realizado en 6 pacientes con LEG mostró mejoría clínica después de la administración de un antagonista de IL-10 [63]. Estos datos sugieren que la internalización de NETs por macrófagos en LEG no es totalmente silente y puede tener un efecto proinflamatorio. Aunado a las alteraciones en su degradación, la secreción de estas citocinas podría constituir otro mecanismo de daño de las NETs en pacientes con LEG.

En conclusión, éste es el primer estudio que demuestra que existen proteínas poliubiquitinadas en las NETs, incluyendo MPO. Además, existen diferencias cuantitativas en los patrones de ubiquitinación entre pacientes con LEG y controles, lo cual podría tener implicaciones en el papel proinflamatorio de las NETs en esta enfermedad. Los pacientes con LEG presentan anticuerpos anti-MPO-Ub, los cuales correlacionan con otras variables de la enfermedad, específicamente con niveles disminuidos de complemento. Por otro lado, la ubiquitina presente en las NETs ocasiona un aumento del flujo de calcio en los macrófagos a través de su receptor, CXCR4. Además, los macrófagos de pacientes con LEG sintetizan citocinas como respuesta a la internalización de NETs, proceso que se sugiere es dependiente de la señalización a través de TLR4. Estos procesos, involucrados en la degradación, así como el perfil de ubiquitinación de las NETs, podrían contribuir a sus efectos proinflamatorios en pacientes con LEG y jugar un papel en la fisiopatogenia de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brinkmann V, R.U., Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A, *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
2. Knight JS, C.-R.C., Kaplan MJ *Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases*. Front Immunol, 2012. **3**:380.
3. Kaplan MJ, R.M., *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2689-95.
4. Brinkmann V, Z.A., *Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?* . J Cell Biol, 2012. **198**(5): p. 773-83.
5. Denny MF, Y.S., Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, McCune WJ, Kaplan MJ, *A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 3284-97.
6. Hakkim A, F.B., Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A, *Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis*. Proc Natl Acad Sci USA 2010. **107**(21): p. 9813-8.
7. Leffler J, M.M., Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, Bengtsson AA, Blom AM, *Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease*. J Immunol 2012. **188**(7): p. 3522-31.
8. Farrera C, F.B., *Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2647-56.
9. Munoz LE, G.U., Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M., *SLE--a disease of clearance deficiency?* Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(9): p. 1101-7.
10. Leffler J, B.A., Blom AM, *The complement system in systemic lupus erythematosus: an update*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(9): p. 1601-6.
11. Villanueva E, Y.S., Berthier CC, Hodglin JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M, Shealy D, Denny MF, Plumas J, Chaperot L, Kretzler M, Bruce AT, Kaplan MJ, *Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus*. J Immunol 2011, 2011. **187**(1): p. 538-52.
12. Garcia-Romo GS, C.S., Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J, Pascual V, *Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus*. Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra20.
13. Lande R, G.D., Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Riccieri V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M, *Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus*. Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra19.
14. Odobasic D, K.A., Holdsworth SR, *Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase*. J Immunol Res, 2016. **2016**;2016:2349817.
15. Smith CK, V.-G.A., Tang C, Knight JS, Mathew A, Padilla RL, Gillespie BW, Carmona-Rivera C, Liu X, Subramanian V, Hasni S, Thompson PR, Heinecke JW, Saran R, Pennathur S, Kaplan MJ., *Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: an additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(9): p. 2532-44.
16. Odobasic D, M.R., O'Sullivan KM, Kettle AJ, Dickerhof N, Summers SA, Kitching AR, Holdsworth SR, *Suppression of Autoimmunity and Renal Disease in Pristane-Induced Lupus by Myeloperoxidase*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(7): p. 1868-80.
17. Utz PJ, A.P., *Posttranslational protein modifications, apoptosis, and the bypass of tolerance to autoantigens*. Arthritis Rheum 1998. **41**: p. 1152-1160.

18. Suzuki, T., Burlingame RW, Casiano CA, Boey ML, Rubin RL, *Antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus: assay dependency and effects of ubiquitination and serum DNA*. J Rheumatol 1994. **21**: p. 1081-1091.
19. Wang Y, L.M., Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA, *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J Cell Biol 2009. **184**(205-213).
20. Knight JS, Z.W., Luo W, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, Hodgins JB, Eitzman DT, Thompson PR, Kaplan MJ, *Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus*. J Clin Invest 2013. **123**(7): p. 2981-93.
21. Liu CL, T.S., Rosenberg JM, Mandelbaum G, Gillespie EC, Gozani OP, Alizadeh AA, Utz PJ, *Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies*. Arthritis Res Ther 2012. **14**(1): p. R25.
22. Liu YC, P.J., Karin M, *Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification*. Nat Rev Immunol 2005. **5**(12): p. 941-52.
23. Gómez-Martín D, D.-Z.M., Alcocer-Varela J. , *Ubiquitination system and autoimmunity: The bridge towards the modulation of the immune response*. Autoimmun Rev, 2008. **7**: p. 284-90.
24. L, H., *Protein regulation by monoubiquitin*. Nat Rev Mol Cell Biol 2001. **2**(195-201).
25. Husnjak K, D.I., *Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 291-322.
26. Jeon MS, A.A., Venuprasad K, Krawczyk C, Sarao R, Elly C, Yang C, Arya S, Bachmaier K, Su L, Bouchard D, Jones R, Gronski M, Ohashi P, Wada T, Bloom D, Fathman CG, Liu YC, Penninger JM, *Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction*. Immunity, 2004. **21**(167-177).
27. Bachmaier K, K.C., Koziaradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A, Mariathasan S, Bouchard D, Wakeham A, Itie A, Le J, Ohashi PS, Sarosi I, Nishina H, Lipkowitz S, Penninger JM, *Regulation of peripheral T cell tolerance by the E3 ubiquitin ligase Cbl-b*. Nature 2000, 2000. **403**(6766): p. 211-6.
28. Chiang YJ, K.H., Brown K, Naramura M, Fukuhara S, Hu RJ, Jang IK, Gutkind JS, Shevach E, Gu H, *Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation*. Nature, 2000. **403**(6766): p. 216-220.
29. Heissmeyer V, M.F., Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K, Gu H, Liu YC, Dustin ML, Rao A, *Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 255-65.
30. Wohlfert EA, C.M., Clark RB, *Resistance to CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b-/- mice*. J Immunol 2004. **173**: p. 1059-65.
31. Gómez-Martín D, I.-S.M., Romo-Tena J, Cruz-Ruiz J, Esparza-López J, Galindo-Campos M, Díaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J. , *Casitas B Lineage Lymphoma b is a key regulator of peripheral tolerance in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(4): p. 1032-42.
32. Majetschak, M., *Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(2): p. 205-19.
33. Takada K, N.H., Hibi N, Tsukada Y, Shibasaki T, Fujise K, Fujimuro M, Sawada H, Yokosawa H, Ohkawa K., *Serum concentrations of free ubiquitin and multiubiquitin chains*. Clin Chem, 1997. **43**(7): p. 1188-95.
34. Daino H, M.I., Takada K, Odajima J, Tanaka H, Ueda S, *Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells*. Blood, 2000. **95**: p. 2577-85.
35. Majetschak M, P.N., Hirsch T, *Targeting the monocytic ubiquitin system with extracellular ubiquitin*. Immunology and cell biology, 2006. **84**: p. 59-65.

36. Alonso S, P.K., Russell DG, Purdy GE, *Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**: p. 6031-6.
37. Saini V, M.A., Majetschak M, *CXC chemokine receptor 4 is a cell surface receptor for extracellular ubiquitin*. J Biol Chem, 2010. **285**(20): p. 15566-76.
38. Saini V, S.D., Ziarek JJ, Nashaat ZN, Campbell EM, Volkman BF, et al, *The CXC chemokine receptor 4 ligands ubiquitin and stromal cell-derived factor-1alpha function through distinct receptor interactions*. J Biol Chem 2011. **286**: p. 33466-77.
39. Majetschak M, K.U., Bardenheuer M, Denz C, Quintel M, Voggenreiter G, et al. , *Extracellular ubiquitin inhibits the TNF-alpha response to endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical illness*. Blood, 2003. **101**: p. 1882-90.
40. Garcia-Covarrubias L, M.E., Sorell LT, Pham SM, Majetschak M, *Ubiquitin enhances the Th2 cytokine response and attenuates ischemia-reperfusion injury in the lung*. Crit Care Med, 2008. **36**: p. 979-82.
41. Wang A, F.A., Tus K, Subramanian S, Liu Y, Lin F, Igarashi P, Zhou XJ, Batteux F, Wong D, Wakeland EK, Mohan C, *CXCR4/CXCL12 hyperexpression plays a pivotal role in the pathogenesis of lupus*. J Immunol, 2009(182): p. 4448-58.
42. Wang A, G.P., Chong BF, Chouzenoux S, Guillevin L, Du Y, Zhou XJ, Lin F, Fairhurst AM, Boudreaux C, Roux C, Wakeland EK, Davis LS, Batteux F, Mohan C., *Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2010. **62**: p. 3436-46.
43. Lugar PL, L.C., Grammer AC, Dave SS, Lipsky PE, *Molecular characterization of circulating plasma cells in patients with active systemic lupus erythematosus*. PloS One, 2012. **7**: p. e44362.
44. Biajoux V, B.A., Freitas C, Martinez V, Thelen M, Lima G, Jakez-Ocampo J, Emilie D, Llorente L, Balabanian K., *Expression of CXCL12 receptors in B cells from Mexican Mestizos patients with systemic Lupus erythematosus*. J Transl Med, 2012. **18**(10): p. 251.
45. MC, H., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
46. Gladman DD, I.D., Urowitz MB, *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000*. J Rheumatol, 2002. **29**: p. 288-91.
47. Clark RA, N.W., *Isolation and functional analysis of neutrophils*, in *Current Protocols in Immunology*, K.A. Coligan JE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, Editor. 2001, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
48. Bouali H, N.P., Nowling TM, Pandey J, Dooley MA, Cooper G, Harley J, Kamen DL, Oates J, Gilkeson G., *Association of the G-463A Myeloperoxidase Gene Polymorphism with Renal Disease in African Americans with Systemic Lupus Erythematosus*. J Rheumatol, 2007. **34**(10): p. 2028-34.
49. Nasr SH, D.A.V., Park HR, Serman PL, Goyzueta JD, Dressler RM, Hazlett SM, Pursell RN, Caputo C, Markowitz GS, *Necrotizing and crescentic lupus nephritis with antineutrophil cytoplasmic antibody seropositivity*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(3): p. 682-90.
50. Jarrot PA, C.L., Hervier B, Daniel L, Vuiblet V, Bardin N, Bertin D, Terrier B, Amoura Z, Andrés E, Rondeau E, Hamidou M, Pennaforte JL, Halfon P, Daugas E, Dussol B, Puéchal X, Kaplanski G, Jourde-Chiche N, *Systemic Lupus Erythematosus and Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Overlap Syndrome in Patients With Biopsy-Proven Glomerulonephritis*. Medicine (Baltimore) 2016. **95**(22): p. e3748.
51. R, W., *Does antigen masking by ubiquitin chains protect from the development of autoimmune diseases?* Front Immunol, 2014. **3**(5): p. 262.
52. Kallenberg CG, H.P., Stegeman CA, *Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(12): p. 661-70.
53. Jennette JC, X.H., Falk RJ, *Pathogenesis of vascular inflammation by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(5): p. 1235-42.

54. Bansal PJ, T.M., *Neonatal microscopic polyangiitis secondary to transfer of maternal myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody resulting in neonatal pulmonary hemorrhage and renal involvement*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2004. **93**(398-401).
55. Carneiro T, G.D., Pinto LA, Inês L, Lopes A, Henriques A, Pedreiro S, Martinho A, Trindade H, Young HA, da Silva JA, Paiva A, *Sera from patients with active systemic lupus erythematosus patients enhance the toll-like receptor 4 response in monocyte subsets*. J Inflamm (Lond), 2015. **2015 May 23;12:38**.
56. Liu Y, Y.H., Zhao M, Lu Q, *TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review*. Clin Rev Allergy Immunol, 2014. **47**(2): p. 136-47.
57. Pérez-Ferro M, S.D.C.C., Sánchez-Pernaute O, *Cell membrane-bound TLR2 and TLR4: potential predictors of active systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*. J Rheumatol, 2016. **43**(7): p. 1444-5.
58. Zhang H, F.R., Guo C, Huang Y, Wang H, Wang S, Zhao J, Yang N, *Anti-dsDNA antibodies bind to TLR4 and activate NLRP3 inflammasome in lupus monocytes/macrophages*. J Transl Med, 2016. **1**(14): p. 156.
59. Llorente L, Z.W., Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, Morel-Fourrier B, Brouet JC, Alarcon-Segovia D, Galanaud P, Emilie D., *Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus*. J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 839-44.
60. Chun HY, C.J., Kim HA, Yun JM, Jeon JY, Ye YM, Kim SH, Park HS, Suh CH, *Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus*. J Clin Immunol, 2007. **27**(5): p. 461-6.
61. Houssiau FA, L.C., Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renaud JC., *Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity*. Lupus, 1995. **4**(5): p. 393-5.
62. Godsell J, R.I., Kandane-Rathnayake R, Hoi A, Nold MF, Morand EF, Harris J, *Clinical associations of IL-10 and IL-37 in systemic lupus erythematosus*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34604.
63. Llorente L, R.-P.Y., García-Padilla C, Claret E, Jakez-Ocampo J, Cardiel MH, Alcocer-Varela J, Grangeot-Keros L, Alarcón-Segovia D, Wijdenes J, Galanaud P, Emilie D., *Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(8): p. 1790-800.