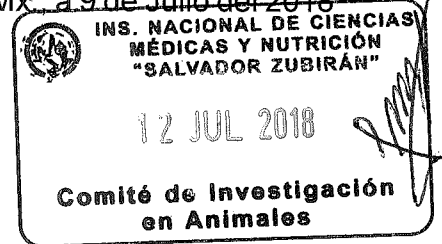




Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Inmunología y Reumatología

México Cd. Mx. a 9 de Julio del 2018



Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo **“Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica”** con registro CINVA IRE-1537-15/18-1 debido a que el tiempo de vigencia del protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente

Dra. Florencia Rosetti
Departamento de Inmunología y Reumatología



Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Inmunología y Reumatología

México Cd. Mx., a 9 de Julio del 2018

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Informe final: CINVA IRE-1537-15/18-1.

“Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica”

No se ha logrado conseguir financiamiento para realizar los experimentos necesarios para realizar este proyecto, por lo que no se ha llevado a cabo en el tiempo que duró la vigencia de la aprobación por el comité (3 años).

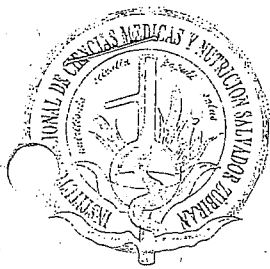
A pesar de no contar con fondos para la parte experimental, este proyecto permitió adquirir fondos de infraestructura, para la compra de una unidad ventilada para el alojamiento de ratones, la cual se encuentra actualmente en función, en el cuarto #3 del DIEB, y ha permitido la realización de otros proyectos que requieren el uso de animales.

En caso de conseguir los fondos para realizar el proyecto con IRE-1537-15/18-1, se solicitará al comité la aprobación para la reapertura del mismo.

Agradezco el tiempo del comité dedicado a este protocolo.

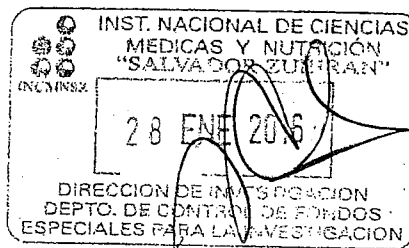
Atentamente,


Dra. Florencia Rosetti
Departamento Inmunología y Reumatología



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

ACUSE



México, D.F., a 27 de enero del 2016.

C. María Teresa Ramírez Cázares
Encargada del Departamento de
Control de Fondos Especiales para la
Investigación Unidad CAD1
P r e s e n t e

Por este conducto le informo que el día de hoy la empresa Y CORPORATION OF AMERICA, INC. realizó la entrega del rack "SISTEMA INTEGRAL VENTILADO COMPLETO PARA EL ALOJAMIENTO DE ROEDORES" que se adquirió con fondos del Proyecto: IRE-1537-15/18-1 (CONACyT Apoyo de Infraestructura).

Sin más por el momento,

Atentamente

[Signature]
Dra. Florencia Roseffi Sciutto
Responsable del Proyecto
Departamento de Inmunología y Reumatología

7 CORPORATION OF AMERICA, INC
 8280 NW 68th St
 Federal TAX I.D 650487813
 Miami, FL 33166
 Tel.: 305-6298808
 Fax: 305-6298809

1420

CUSTOMER ORDER NO.	DATE	PAGE
Nutricion	1/25/2016	1

SELL TO:
Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Vasco de Quiroga 15. Colonia Seccion XVI. Tlalpan Mexico, DF 14000 Mexico

SHIP TO:
Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Vasco de Quiroga 15. Colonia Seccion XVI. Tlalpan Mexico, DF 14000 Mexico

PO NO	TERMS	SALES PERSON	SHIP VIA	SHIP DATE	FOB
	Prepaid			1/25/2016	DDP

ITEM	QUANTITY	UNIT	DESCRIPTION	TAX	UNIT PRICE	AMOUNT
71880 AR	1.00		71880AR "Sistema RAIR HD, Super Mouse 1800™ AllerZone™ Micro-Isolator™ Rack de dos lados (soldado) sostiene (80) Super Mouse 1800™ AllerZone™ Micro-Isolator™ o (160) Super Mouse 750™ AllerZone™ Micro-Isolator™. Incluye: #76014C - RAIR HD Enviro-Gard Supply Blower Kit - Includes (2) RAIR Enviro-Gard™ HEPA filtered air supply units (1) control panel, and (1) power supply with power cord and cables with connectors. (for use with double sided rack) #76014ECD - RAIR Enviro-Gard kit with (2) RAIR Enviro-Gard Exhaust units, connection cables and the stainless steel plenum transition. Qty 1. Includes: 75059ZF-GA SUPER MOUSE 750 ALLERZONE MICRO-ISOLATOR SYSTEMS Zyfone High Temperature Plastic. Includes: Cat no. 75031 Zyfone Cage 12-7/8"L x 7-1/2"W x 5-5/8"D, Cat no. 75053ZF Zyfone Micro-Isolator (with AllerZone) Filter Top, and Cat no. 75034HYP Modular Diet Delivery System (mice) 260 75043 Zyfone 750 15 oz Bottle Qty 260 30211ZF Zyfone One Cap (Twist Cap) Qty 260 30110S 1" Straight sipper tube Qty	X	\$55,000.00	\$55,000.00

COMMENTS:
Prices DDP Mexico City

SUBTOTAL	\$55,000.00
FREIGHT	\$0.00
TAX	\$0.00
TOTAL AMOUNT	\$55,000.00
AMOUNT RECEIVED	\$55,000.00
BALANCE DUE	\$0.00



Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Inmunología y Reumatología

México Cd. Mx., a 9 de Julio del 2018

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Informe final: CINVA IRE-1537-15/18-1.

“Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica”

Este protocolo se escribió como una propuesta para la convocatoria de infraestructura (INFR-2015). El proyecto recibió dicho apoyo, con lo que se equipó mi laboratorio y se adquirió una unidad ventilada para el alojamiento de ratones, que se encuentra en uso en el cuarto 3 del DIEB. Con el fin de llevar a cabo la parte experimental del proyecto, éste se volvió a someter, bajo el marco de la convocatoria de Ciencia Básica 2015. Desafortunadamente, no se obtuvo dicho financiamiento, por lo que la parte experimental no se llevó a cabo.

Atentamente,


Dra. Florencia Rosetti
Departamento Inmunología y Reumatología



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Acuse

México Cd., Mx a 26 de abril de 2018.

No. Oficio CINVA 070-18

Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Depto. Inmunología y Reumatología
P r e s e n t e.

Estimada Dra. Rosetti.:

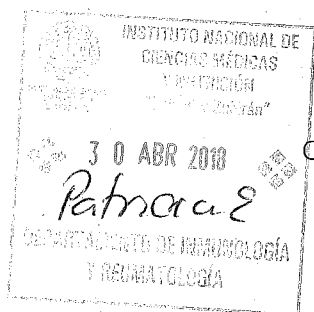
Por este conducto le informo que su proyecto con título "DESARROLLO DE UN MODELO DE PÉRDIDA DE TOLERANCIA DE CÉLULAS T EN AUTOINMUNIDAD SISTÉMICA", con registro CINVA IRE-1537-15/18-1 finalizará en junio 2018. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Informe final
2. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx

NABS/hom

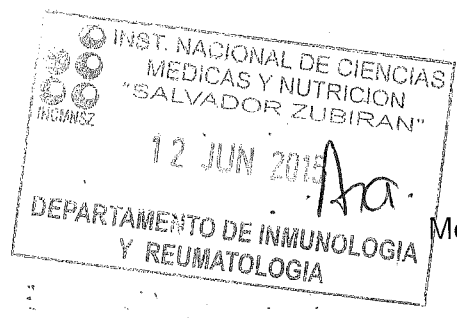
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO
30 ABR 2018
INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z."
1810 10:13

Acceso



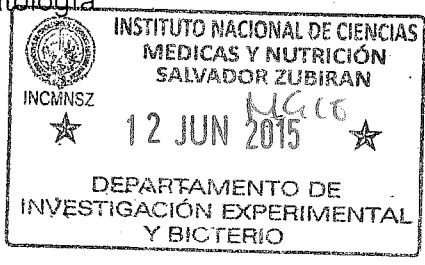
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"



México, D. F., a 12 de Junio del 2015.

Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Depto. Inmunología y Reumatología
Presente.



900
REF: CINVA-1537, IRE-1537-15/18/1

Estimada Dra. Rosetti:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica"

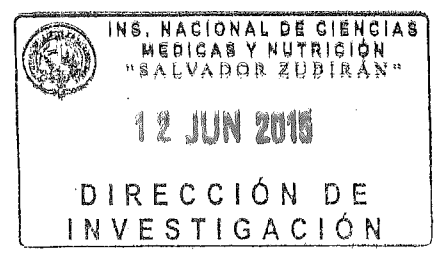
Este comité ha dictaminado **aprobarlo** a partir de esta fecha.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,
[Handwritten Signature]

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio



Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

México, D.F. a 18 de Mayo, 2015

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora
Comisión de Investigación en Animales.

Estimada Dra. Bobadilla,

Agradezco a Usted y al Comité el tiempo dedicado en evaluar mi proyecto titulado "Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica", con REF: CINVA 1537, Clave: IRE-1537-15/18-1. De acuerdo con lo sugerido por Usted, he realizado los siguientes cambios y aclaraciones:

1. Es necesario conocer el programa de reproducción de los animales modificados genéticamente y establecer un programa de producción.

Se ha incluido, en el punto 7 del Formato de Apoyo a la Evaluación de Protocolos, un programa de producción de cepas y reproducción.

2. En caso de que los animales sean heterocigotos, establecer quién será el responsable de la genotipificación de los animales.

Florencia Rosetti, será la responsable de la genotipificación y generación de las cepas transgénicas. Esto ha sido aclarado en el punto 10 del Formato de Apoyo a la Evaluación de Protocolos.

3. Definir el genotipo de cada ratón KO que se utilizará.

Este punto ha sido aclarado en el punto 7 de del Formato de Apoyo a la Evaluación de Protocolos.

4. Se solicita justificar el tamaño de muestra de cada grupo a estudiar.

La Justificación del tamaño de muestra de cada grupo a estudiar se ha incluido en el punto 5 del FAEP.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

5. Justificar claramente por qué se utilizarán 160 ratones C57BL/6 para establecer el modelo.

La Justificación del número de ratones que se utilizarán se ha expandido en el punto 5 del FAEP.

- 6. El estudio comprende la inclusión de 4 colonias de ratones durante tres años. Para lo cual requerirán 50 ratones para el pie de cría. Es necesario considerar el espacio para los animales, equipo y requerimientos de arrobo de éstos (certificado microbiológico y cuarentena).

La M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio del INCMNSZ nos aprobó espacio en el bioterio. Nosotros nos encargaremos de la compra de los racks que alojarán a los ratones y el bioterio nos dará apoyo técnico para el mantenimiento y limpieza de las jaulas (cambio de cama, agua y comida). Nosotros nos haremos responsables de la producción y genotipificación de los ratones.

El Bioterio del INCMNSZ cuenta actualmente con la generación continua de ratones C57BL/7. Los ratones OTII serán comprados de The Jackson Laboratories, ME, USA. Los cuales cuentan con certificado microbiológico y podrán ser aceptados en el bioterio sin la necesidad de pasar por cuarentena. Ratones C57BL/6.PD1-/- y PDL1-/- se encuentran en el bioterio del Instituto Investigaciones Biomédicas. Para poder ingresar a estos ratones a nuestro bioterio, se requerirá del paso por cuarentena y el certificado de salud del bioterio de donde provienen (IIB, UNAM). Estos tiempos están contemplados en el calendario experimental. Hemos discutido estos puntos con la M.V.Z. Mariela Contreras.

Esto está ahora aclarado en el punto 5 del FAEP.



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

7. En relación a la vía intravenosa, no se menciona el lugar de administración y el volumen a administrar.

Las inyecciones intravenosas se realizarán en las venas de la cola de los ratones, en un volumen menor de 200 μ L. Esto fue aclarado en el punto 3 del Formato de Apoyo a la Evaluación de Protocolos.

8. Justificar el tiempo de permanencia de hasta 12 meses de 50 animales.

Esto está ahora aclarado en el punto 8 del Formato de Apoyo a la Evaluación de Protocolos.

9. El isofluorano inducirá anestesia y no sedación para la obtención de sangre por vía retroorbital. Definir el número de veces que cada ratón será sometido a este procedimiento y si es más de una vez, se deberá anexar la información que avale llevar a cabo este procedimiento en más de una ocasión.

a) Debido a que no se requieren grandes cantidades de sangre para los propósitos de este trabajo, hemos decidido obtener sangre a través de la vena de la cola. Así, se colectarán 50 μ L de sangre de la vena de la cola. Este procedimiento no requiere utilizar agentes anestésicos.

b) A los ratones que se decida mantener por 12 meses, se les monitoreará el desarrollo de autoinmunidad crónica (presencia de autoanticuerpos en suero). Para esto, se colectarán 50 μ L de sangre cada dos meses, a partir de la primera inmunización.

Esto ha sido modificado en los puntos 9, 10, 11 y 12 del Formato de Apoyo a la Evaluación de Protocolos.



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

10. En el protocolo y en el FAEP debe incluirse quien realizará los procedimientos con los ratones, si está capacitado para obtener muestras de sangre del ojo, la inyección en la vena y vía SC, colocación de sondas y cánulas, así como el responsable de la producción de las colonias.

Florencia Rosetti y José Carlos Crispín-realizarán los procedimientos (obtención de sangre, inyecciones intravenosas y subcutáneas). Los dos contamos con 8 años de experiencia en manejo de ratones y realización de éstos procedimientos. No se colocarán sondas ni cánulas. Florencia Rosetti será la responsable de la producción de las colonias.

Esto está ahora aclarado en el protocolo y el FAEP.

11. Se menciona en el protocolo que se requerirán de jaulas metabólicas para la colección de orina, pero el DIEB no cuenta con este equipo, favor de aclarar este punto.

El procedimiento para la toma de muestra de orinas no fue especificada en el protocolo. Se obtendrán orinas cada dos semanas manualmente, como se ha realizado en trabajos previos (Rosetti F. et al J Immunol 2012, y Venkatesh D. et al Immunity 2013). No se utilizarán cajas metabólicas para este propósito. Esto se ha aclarado en el protocolo.

12. Se recomienda que el investigador registre los cambios de comportamiento y punto final de experimentación mediante la observación continua de los ratones.

Esto ha sido aclarado en el punto 15 del FAEP.

13. Es necesario que conozca los parámetros del grado de anestesia, solo menciona que disminuye a frecuencia respiratoria.

El uso de anestésicos ha sido eliminado del protocolo.



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

14. Aclarar cuál será el destino final de los cadáveres después de la eutanasia.

Los cadáveres serán colocados en una bolsa amarilla que tenga la leyenda "Residuo Biológico" y será colocado en el lugar de desechos biológicos para su eliminación.

Esto ha sido aclarado en el punto 18 del FAEP.

Las modificaciones realizadas al protocolo y al FAEP se encuentran marcadas en amarillo. Espero que estas correcciones y aclaraciones al protocolo permitan su aprobación.

Atentamente,

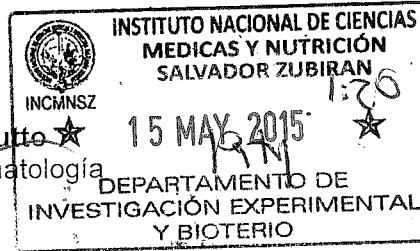
Dra. Florencia Rosetti
Investigadora en Ciencias Médicas

Acuse



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



México, D. F., a 15 de Mayo del 2015.

Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Depto. Inmunología y Reumatología
Presente.

REF: CINVA 1537, Clave: IRE-1537-15/18-1

Estimada Dra. Rosetti:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

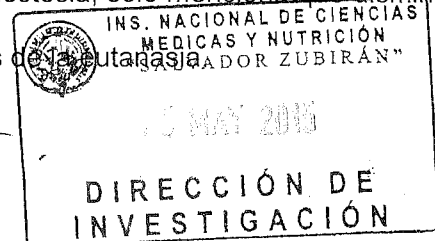
"Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica"

Este comité ha dictaminado dejar **Pendiente** la aprobación hasta que se aclaren las siguientes **observaciones**:

1. Es necesario conocer el programa de reproducción de los animales modificados genéticamente y establecer un programa de producción.
2. En caso de que los animales sean heterocigotos, establecer quien será el responsable de la genotipificación de los animales.
3. Definir el genotipo de cada ratón KO que se utilizará.
4. Se solicita justificar el tamaño de muestra de cada grupo a estudiar.
5. Justificar claramente por qué se utilizarán 160 ratones C57BL/6 para establecer el modelo.
6. El estudio comprende la inclusión de 4 colonias de ratones (C57BL/6, C57BL/6.OTII, PD1L-/-OTII y PD1L-/-OTII) durante tres años, para lo cual requerirán 50 ratones para el pie de cría. Es necesario considerar el espacio para los animales, equipo y requerimientos de arribo de éstos (certificado microbiológico y cuarentena).
7. En relación a la vía intravenosa, no se menciona el lugar de administración y el volumen a administrar.
8. Justificar el tiempo de permanencia de hasta de 12 meses de 50 animales.
9. El isofluorano inducirá anestesia y no sedación para la obtención de sangre por vía retroorbital. Definir el número de veces que cada ratón será sometido a este procedimiento y si es mas de una vez, se deberá anexar la información que avale llevar a cabo este procedimiento en mas de una ocasión.
10. En el protocolo y en el FAEP debe incluirse quien realizará los procedimientos con los ratones, si está capacitado para obtener la muestra de sangre del ojo, la inyección en la vena y vía SC, colocación de sondas y cánulas, así como el responsable de la producción de las colonias.
11. Se menciona en el protocolo que se requerirán jaulas metabólicas para la colección de orina, pero el DIEB no cuenta con este equipo, favor de aclarar este punto.
12. Se recomienda que el investigador registre los cambios de comportamiento y punto final de experimentación mediante la observación continua de los ratones.
13. Es necesario que conozca los parámetros del grado de anestesia, solo menciona que disminuye la frecuencia respiratoria.
14. Aclarar cual será el destino final de los cadáveres después de la eutanasia.

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

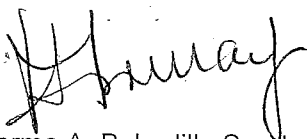
Recibi original
5/15/15
Florencia Rosetti



Es importante que las correcciones las haga en el Sistema de Latis y envíe una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado. La respuesta al comité y el protocolo modificado en el sistema Latis deberá entregarse en forma impresa y el pdf por vía electrónica a los correos: norma.bobadillas@incmnsz.mx y nayelort@hotmail.com.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,



Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio

NAB/nom



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 23/03/2015

CLAVE: IRE-1537-15/16-1

TÍTULO: Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica

INVESTIGADOR RESPONSABLE: ROSETTI SCIUTTO FLORENCIA

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología	\$ 2,500,000.00

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 29/06/2015 al 28/06/2016

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 0.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 2,500,000.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)			
Materiales	\$ 0.00	FIRMAS	
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		Investigador responsable	Jefe de Departamento
Animales	\$ 0.00		
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
Estudios	\$ 0.00	Director de Investigación	Director General
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viaticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 0.00		
(costo directos de publicación, sobreiro)			
		Fecha de resolución 5 - AGOSTO - 2015	

Suscripciones	\$ 0.00
libros, revistas, software, periódicos, etc)	
Varios	\$ 0.00
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Fondo de apoyo	
\$ 0.00	
15% de la cantidad total del proyecto	
Total :	\$ 2,500,000.00



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:
FOLIO DE REGISTRO: IRE-1537-15/18-1

Fecha de registro del Protocolo:

Título del Protocolo:
Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica

Propuesta: a) Nueva

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Florencia Rosetti Sciutto
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran
Departamento de Adscripción	Inmunología y Reumatología
Teléfono	54870900 ext 2610
Correo electrónico	florencia.rosettis@incmnsz.mx

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Florencia Rosetti Sciutto	ICMNSZ	Doctorado	54870900 ext 2610	florencia.rosettis@incmnsz.mx
José Carlos Crispín Acuña	ICMNSZ*	Doctorado	54870900 ext 2610	carlos.crispina@incmnsz.mx
Jorge Alcocer Varela	ICMNSZ	Doctorado	Ö	Ö

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	Mayo 2015		
Fecha tentativa de finalización.	Mayo 2018		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un modelo murino que permita identificar los elementos que operan a nivel de las células CD4 para evitar que células B autoreactivas inicien respuestas autoinmunes patológicas.

Con este fin: a) generaremos histonas modificadas genéticamente para expresar el epítipo de ovoalbúmina (OVA) que reconocen las células OT-II; b) crearemos líneas celulares que expresen de manera estable e incorporen a la cromatina la histona-OVA; c) demostraremos la inmunogenicidad de la proteína quimérica en ratones; d) estudiaremos en qué condiciones las células OT-II son capaces de promover respuestas inmunes en contra de autoantígenos intranucleares, en particular DNA; e) evaluaremos la función, en este modelo, de moléculas involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, en particular PD1 y PDL1.

- 3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Los modelos murinos de lupus han sido muy útiles para estudiar los mecanismos de daño a órganos blanco. Sin embargo, no son adecuados para el estudio de los eventos iniciales de pérdida de tolerancia. La gran mayoría consisten en enfermedades murinas similares al lupus (desarrollo de AANs, depósito de complejos inmunes, glomerulonefritis) que son promovidas por muchos genes, en gran parte desconocidos. En estos modelos, la pérdida de tolerancia sucede en etapas tempranas y, como en los pacientes humanos, es guiada por células de identidad y especificidad desconocidas.

Con el fin de estudiar a detalle las características de la célula T CD4 que participa en la pérdida de tolerancia hacia antígenos intranucleares, propongo el desarrollo de un modelo basado en la presencia de células T CD4 con un TCR conocido, dirigido en contra de un epítipo de histona. El desarrollo de este modelo implica desafíos técnicos, que incluyen la identificación y expansión de células T específicas a histonas, la clonación del TCR y su expresión en ratones en forma transgénica, la idoneidad del TCR clonado y la posibilidad de que al expresarlo en ratones las células sean eliminadas por selección negativa. Para abordar el desarrollo de este modelo, contemplo una estrategia experimental que aprovechará la existencia de un TCR transgénico disponible y muy bien estudiado (OT-II) y me enfocaré en la generación de histonas modificadas genéticamente para expresar el epítipo específico que reconoce el TCR OT-II.

Se generarán líneas celulares que expresen en forma estable histonas genéticamente modificadas. Para inducir una respuesta anti-DNA con ayuda de células T CD4 de especificidad conocida (OT-II), incorporaré a una histona el epítipo que reconoce el TCR OT-II (AAHAEINEA)

Con el propósito de evaluar si las histonas que expresan el péptido de OVA, son capaces de inducir una respuesta inmune específica, se utilizarán ratones C57BL/6 y células T CD4 obtenidas de ratones de la misma cepa pero que expresan el TCR transgénico OT-II. Aislaremos células T CD4 de ganglios linfáticos de ratones OT-II e inyectaremos 2×10^6 células por vía intravenosa a ratones C57BL/6. Dos días después, los ratones serán inmunizados subcutáneamente con extractos nucleares quiméricos o control en presencia de un adyuvante (adyuvante completo de Freund o Alum; $100 \mu\text{L}$). Tres, 7, 14 y 21 días después de la inmunización, se sacrificarán los ratones y se colectarán los bazo para ser analizados. Mediremos la expansión de células OT-II (número de células por bazo), su proliferación (antes de ser inyectadas se marcarán con CFSE) y su expresión de marcadores de activación (CD44). Se distinguirán las células OT-II de las células CD4 nativas por medio de un anticuerpo monoclonal que reconoce el TCR OT-II y con un marcador congénico (CD45.1).

Posteriormente se **investigarán los elementos que regulan la tolerancia a antígenos intranucleares.**

El desarrollo de histonas quiméricas capaces de estimular a células T CD4 de especificidad conocida nos permitirá contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Se producen anticuerpos anti-DNA tras la activación de células T CD4 que reconocen histonas? Inmunizaremos ratones con el protocolo optimizado y evaluaremos el desarrollo de AANs incluyendo anticuerpos anti-DNA. Como control, inmunizaremos con nucleosomas tratados con DNAsa y con



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

nucleosomas nativos (sin el péptido derivado de OVA). Investigaremos el efecto de varios parámetros incluyendo: a) *frecuencia de células OT-II*. Variar el número de células transferidas, nos permitirá evaluar cuántas células T autoreactivas (específicas a histonas-OVA) son necesarias para la pérdida de tolerancia a DNA; b) *estado basal de las células OT-II*. Transferiremos células vírgenes y células activadas *in vitro*. Este experimento es importante porque se ha propuesto que uno de los factores que desencadenan la autoinmunidad es el mimetismo antigénico, donde células autoreactivas se activan por antígenos similares presentados en el contexto de una infección; c) *inmunizaciones repetidas*. Investigaremos si la pérdida de tolerancia sucede a la primera inmunización, o si se requieren de activaciones repetidas (únicamente la primera inmunización se realizará en presencia de adyuvante); d) *papel de moléculas de coestimulación negativa*. Cuál es el papel de PD1 y PDL1 en la inducción de esta respuesta.

2. ¿Se perpetúa la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares, o se regula y desaparece? El desarrollo de autoanticuerpos después de infecciones es un fenómeno bien descrito (Barzilai et al., 2007), pero en individuos sanos los autoanticuerpos desaparecen espontáneamente. Asimismo, la inyección de células apoptóticas a ratones causa la aparición de AANs que desaparecen al cabo de 2 o 3 semanas. Evaluaremos si la presencia de células T específicas a histonas permite la perpetuación de la respuesta autoinmune.

3. ¿Se desarrollan manifestaciones autoinmunes tras la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares? Estudios epidemiológicos han mostrado que la pérdida de tolerancia en pacientes con LEG sucede de manera paulatina, años antes de la aparición de las manifestaciones clínicas. Esto sugiere que la presencia de autoanticuerpos no es suficiente para el desarrollo de inmunopatología. Si logramos inducir una respuesta autoinmune sostenida, investigaremos la presencia de manifestaciones asociadas, en particular glomerulonefritis y dermatitis.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría D: Por el uso de adyuvantes

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio:

Se estima que se necesitarán en total 400 ratones para realizar el proyecto. Esto incluye ratones receptores de células efectoras y ratones de los cuales se obtendrán las células.

De éstos, se requerirá un máximo de **160 ratones C57BL/6**, para establecer el modelo: Se planea evaluar un total de 4 histonas quiméricas que serán comparadas con histonas nativas y un grupo control sin extractos nucleares. Estos ratones serán sacrificados en 3 momentos para ser evaluados (día 7, 14 y 21 después de la inmunización). Por la heterogeneidad que se puede obtener con experimentos *in vivo*, se estima que un total de 7 ratones por grupo serán necesarios. De éstos ratones también se obtendrán los fibroblastos de embriones murinos que posteriormente se mantendrán en cultivo y serán expandidas *in vitro*.

150 ratones C57BL/6.OTII serán utilizados para obtención de células que serán transferidas a los animales experimentales y adicionalmente se utilizarán para estudios de activación celular y caracterización de las respuestas inmunes *in vitro*.

Una vez establecido el modelo y las condiciones óptimas de activación celular, se evaluará la función de las moléculas coestimuladoras negativas en este modelo, así como en estudios *in vitro*. Para esto, se obtendrán células CD4 OTII de ratones **PD1-/- .OTII y PD1L-/- .OTII**. Por este motivo, solicitamos **20 ratones** de cada una de éstas cepas.

Para el mantenimiento de éstas 4 colonias (C57BL/6, C57BL/6.OTII, PD1-/- .OTII y PD1L-/- .OTII), por tres años, se requieren **50 ratones como pie de cría**, los cuales incluyen hembras y machos.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario. Se espera que no sea necesario movilizar a los ratones fuera del bioterio durante el periodo experimental. En el momento del sacrificio de los ratones se movilizarán al laboratorio ubicado dentro del Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ. Para esto, se llevarán cargados en las cajas correspondientes directamente del Bioterio al laboratorio.

7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
C57BL/6 (ratones experimentales)	150	20-22g	8-10 semanas	Hembras
C57BL/6.OTII (donadores de células)	150	20-22g	8-10 semanas	Hembras
C57BL/6 (para obtención de fibroblastos de embriones murinos)	10	20-25g	8-16 semanas	Hembras
C57BL/6 PD1-/- .OTII (donadores de células)	20	20-25g	8-16 semanas	Hembras
C57BL/6 PD1L-/- .OTII (donadores de células)	20	20-25g	8-16 semanas	Hembras
C57BL/6, C57BL/6 OTII, C57BL/6 PD1-/- .OTII y C57BL/6 PDL1-/- .OTII (ratones para mantener la colonia)	50	20-25g	8-30 semanas	Hembras y Machos
No. de Grupos experimentales: 10				
No. de animales por grupo: 15				
No. TOTAL DE ANIMALES: 400				

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB. Dependiendo los resultados experimentales, algunos animales permanecerán hasta 12 meses en el bioterio (~50 animales). El resto, serán sacrificados dentro de las primeras 12-18 semanas.

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.		X	Sangre 200uL una vez al mes, retroorbital. Orina, una vez cada 2 semanas.
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	Núcleos celulares vía intravenosa
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)		X	CFA 100µL y Alum 100µL vía subcutánea – única ocasión
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

Obtención de fibroblastos de embrión murino (MEFs):

Las hembras se colocarán con los machos y al día siguiente se buscará la presencia de *plug* como dato de coito positivo. En caso de encontrarse, las ratonas serán sacrificadas al día 13-14 post-coito bajo las condiciones establecidas en el Instituto (cámara de CO₂). Se aislarán los úteros de los cuales se obtendrán los embriones con los que se trabajará para aislar los fibroblastos.

Aislamiento de Células OTII, PD1-/- OTII y PDL1-/- OTII:

Los ratones serán sacrificados bajo la norma institucional y se diseccionarán ganglios linfáticos y bazo para obtener células T CD4.

Inmunización de ratones y obtención de muestras:

2x10⁵ células serán inyectadas intravenosamente a ratones C57BL/6, utilizando un sujetador para roedores. Dos días después, los ratones serán inmunizados subcutáneamente con los núcleos quiméricos o control en presencia de un adyuvante (adyuvante completo de Freund o Alum; 100µL), éstas inyecciones se realizarán en ausencia de sedación. Tres, 7, 14 y 21 días después de la inmunización, se sacrificarán los ratones y se colectarán los bazo y ganglios linfáticos para ser analizados. En caso de confirmarse la activación de las células OTII, los ratones no serán sacrificados y se evaluará la presencia de anticuerpos antinucleares en suero. Para esto, se colectarán 200µL de sangre por vía retro-orbital, bajo sedación con isoflurano. Además, a partir de la semana 20, se colectará orina cada semana para evaluar datos de daño renal. Esto se realizará sin alterar el estado de conciencia del roedor, ya que no es un procedimiento que cause dolor alguno.

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Isoflurano	Anestético Líquido, No flamable	1-2%	Vaporizable	Para obtener muestras de sangre; una vez al mes



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Se observará al ratón y cuando éste se encuentre quieto, disminuya su frecuencia respiratoria y no responda a estímulos táctiles se realizará el procedimiento.

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

No se realizarán procedimientos quirúrgicos en éstos ratones.

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

No se espera que éstos parámetros cambien significativamente en este estudio.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal	0			
b) Apariencia	0			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	0			
d) Conducta espontánea.	0			
e) Conducta provocada.	0			

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

En caso de cualquier signo de gravedad (pérdida de peso mayor al 20% y cambios de comportamiento), el estudio se dará por terminado.

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 1. 0 si es normal.
 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 3. 2 si está afectado
 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Asfixia con CO₂

17) El protocolo representa riesgo biológico?

No

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?

El destino final de todos los ratones que se utilizarán en este proyecto es la obtención de órganos para distintos análisis. De algunos se obtendrán células, de otros sueros y tejidos que se analizarán histopatológicamente.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Florencia Rosetti Sciutto
Nombre y firma del Investigador Responsable

	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

COMITÉ INSTITUCIONAL
DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN HUMANOS

**FORMATO DE
EVALUACIÓN DE
PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

No. de registro CIIBH: IRE-1537-15/18-1

1. Título del proyecto

Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
CRISPIN ACUÑA JOSE CARLOS	Investigador en Ciencias Médicas "C"	Investigador asociado	2610	carlos.crispina@incmnsz.mx
ROSETTI SCIUTTO FLORENCIA	Investigadora en Ciencias Médicas "C"	Investigador responsable	2610	florencia.rosettis@incmnsz.mx

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

Florencia Rosetti y José Carlos Crispín realizarán los procedimientos (obtención de sangre, inyecciones intravenosas y subcutáneas). Los dos contamos con 8 años de experiencia en manejo de ratones y realización de éstos procedimientos.

Florencia Rosetti será la responsable de la producción de las colonias

3. Instituciones participantes

4. Patrocinio

Se solicitó apoyo financiero a CONACyT y a Pfizer para realizar este trabajo. Además, nos aprobaron un proyecto de fondos para infraestructura del CONACyT. Esto nos permitirá comprar los racks para alojar a los ratones.

4a. Organismos patrocinadores

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

Este proyecto contempla el desarrollo de un nuevo modelo murino que permitirá analizar en un sistema in vivo qué elementos contribuyen a la pérdida de tolerancia y, por lo tanto, a la iniciación de la respuesta autoinmune.

La propuesta se presenta como el desarrollo del modelo, pero es importante enfatizar que, una vez establecido, el modelo servirá como plataforma para el estudio de moléculas asociadas a enfermedad autoinmune en estudios genéticos, clínicos, y epidemiológicos. Así, este proyecto representa el inicio de un laboratorio de estudios de enfermedades autoinmunes en el que participarán varios investigadores de los Institutos Nacionales de Salud interesados en investigar el papel que juega el sistema inmune en la patogénesis de enfermedades humanas.

He escogido al Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) como enfermedad prototipo porque es una de las enfermedades autoinmunes sistémicas más frecuentes en población mexicana y porque el LEG es un modelo ideal para estudiar la pérdida de tolerancia y el desarrollo de daño a órganos blancos. Los pacientes con LEG montan una respuesta autoinmune crónica que se manifiesta por la aparición de anticuerpos antinucleares (AANs) que forman complejos inmunes y se depositan en lechos vasculares causando inflamación. Así, la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares representa un elemento fundamental en la patogénesis del LEG.

Por qué en pacientes con LEG se pierde la tolerancia y por qué la respuesta autoinmune se perpetúa son preguntas abiertas que aún continúan sin respuesta, en gran parte, por la falta de herramientas adecuadas. **Este proyecto desarrollará un modelo que permitirá responder estas preguntas y esclarecer qué elementos participan en la pérdida de tolerancia.**

Existe evidencia de que la respuesta autoinmune de los pacientes con LEG es un proceso guiado por células T CD4 porque los AANs exhiben marcas que sugieren que maduraron en un centro germinal: son IgG, de alta afinidad, con mutaciones somáticas en las regiones V_H (van Es et al., 1991; Winkler et al., 1992). Estudios previos han mostrado que las células T CD4 que reconocen histonas son capaces de estimular la producción de anticuerpos anti-DNA. Así, se ha propuesto un modelo en el que una célula B con un receptor autoreactivo reconoce DNA en un nucleosoma y tras endocitarlo y procesarlo, presenta un péptido derivado de histona a una célula T CD4.

Las células B y las T ensamblan su receptor a través de la combinación aleatoria de segmentos de DNA. Este proceso permite la formación de repertorios de gran diversidad, pero implica la necesidad de un proceso de selección que elimine a las células autoreactivas. A pesar de esto, en personas sanas, la frecuencia de células B autoreactivas oscila entre 5 y 20% (Yurasov et al., 2005). En pacientes con LEG, la frecuencia es aún mayor. Por otro lado, las células T se someten en el timo a un proceso de selección rigurosa que resulta en una muy

baja frecuencia de células T autoreactivas, tanto en sujetos sanos como en pacientes con LEG (van Es et al., 1991).

Esto sugiere que el repertorio de células B se controla en una forma menos rigurosa que el de células T, probablemente para permitir un nivel de diversidad máximo. El hecho de que en condiciones normales esto no conduzca a autoinmunidad, implica que existen mecanismos que limitan que las células B autoreactivas se activen con antígenos propios.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

El desarrollo de un modelo murino de pérdida de tolerancia, donde las células T tienen un TCR conocido, y la respuesta inmune celular es dirigida a un antígeno específico (un epítipo transgénicamente expresado asociado a histonas), permitirá contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Se producen anticuerpos anti-DNA tras la activación de células T CD4 que reconocen histonas?
2. ¿Se perpetúa la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares, o se regula y desaparece?
3. ¿Se desarrollan manifestaciones autoinmunes tras la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares?

JUSTIFICACION :

Los modelos murinos de lupus han sido muy útiles para estudiar los mecanismos de daño a órganos blanco. Sin embargo, no son adecuados para el estudio de los eventos iniciales de pérdida de tolerancia. La gran mayoría consisten en enfermedades murinas similares al lupus (desarrollo de AANs, depósito de complejos inmunes, glomerulonefritis) que son promovidas por muchos genes, en gran parte desconocidos. En estos modelos, la pérdida de tolerancia sucede en etapas tempranas y, como en los pacientes humanos, es guiada por células de identidad y especificidad desconocidas.

Con el fin de estudiar a detalle las características de la célula T CD4 que participa en la pérdida de tolerancia hacia antígenos intranucleares, propongo el desarrollo de un modelo basado en la presencia de células T CD4 con un TCR conocido, dirigido en contra de un epítipo de histona.

6a. Hipótesis

La expresión transgénica del epítotope de células OTII en histonas permitirá a las células T CD4 OTII romper la tolerancia hacia auto-antígenos nucleares.

6b. Objetivos.

General:

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un modelo murino que permita identificar los elementos que operan a nivel de las células CD4 para evitar que células B autoreactivas inicien respuestas autoinmunes patológicas.

Específicos:

Con este fin:

- a) generaremos histonas modificadas genéticamente para expresar el epítotope de ovoalbúmina (OVA) que reconocen las células OT-II
- b) crearemos líneas celulares que expresen de manera estable e incorporen a la cromatina la histona-OVA
- c) demostraremos la inmunogenicidad de la proteína quimérica en ratones
- d) estudiaremos en qué condiciones las células OT-II son capaces de promover respuestas inmunes en contra de auto-antígenos intranucleares, en particular DNA
- e) evaluaremos la función, en éste modelo, de moléculas involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, en particular PD1 y PDL1.

7. Metodología: Diseño general.

Serán generadas líneas celulares que expresen en forma estable histonas genéticamente modificadas para expresar el epítotope de reconocimiento del TCR OTII.

Se generarán líneas celulares que expresen en forma estable histonas genéticamente modificadas para expresar el epítotope de reconocimiento del TCR OTII, un péptido derivado de OVA. Con el propósito de evaluar si las proteínas transgénicas son capaces de inducir una respuesta inmune específica, se utilizarán ratones C57BL/6 y células T CD4 obtenidas de ratones de la misma cepa pero que expresan el TCR transgénico OT-II (Robertson et al., 2000).

Aislaremos los núcleos de células que contengan histonas nativas o histonas quiméricas. Aislaremos células T CD4 de ganglios linfáticos de ratones OT-II e inyectaremos 2×10^6 células por vía intravenosa a ratones C57BL/6. Dos días después, los ratones serán inmunizados subcutáneamente con los nucleosomas quiméricos o control en presencia de un adyuvante (adyuvante completo de Freund o Alum). Tres, 7, 14 y 21 días después de la inmunización, se

sacrificaran los ratones y se colectaran los bazo para ser analizados. Mediremos la expansión de células OT-II (número de células por bazo), su proliferación (antes de ser inyectadas se marcarán con CFSE) y su expresión de marcadores de activación (CD44). Se distinguirán las células OT-II de las células CD4 nativas por medio de un anticuerpo monoclonal que reconoce el TCR OT-II y con un marcador congénico (CD45.1).

Se optimizaremos el protocolo de inmunización: identificaremos cuál(es) histona(s) quiméricas estimulan mejor, a qué concentración, con qué adyuvante (completo de Freund vs. Alum), cuál es la cantidad óptima de células OT-II que deben ser transferidas. Así, al concluir esta sección, tendremos una o más histonas quiméricas capaces de inducir la activación de células T CD4 OT-II en ratones C57BL/6.

Posteriormente investigaremos los elementos que regulan la tolerancia a antígenos intranucleares. El desarrollo de histonas quiméricas capaces de estimular a células T CD4 de especificidad conocida nos permitirá contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Se producen anticuerpos anti-DNA tras la activación de células T CD4 que reconocen histonas? Inmunizaremos ratones con el protocolo optimizado mencionado anteriormente y evaluaremos el desarrollo de AANs incluyendo anticuerpos anti-DNA. Como control, inmunizaremos con nucleosomas tratados con DNAsa y con nucleosomas nativos (sin el péptido derivado de OVA). Investigaremos el efecto de varios parámetros incluyendo: a) *frecuencia de células OT-II*. Variar el número de células transferidas, nos permitirá evaluar cuántas células T autoreactivas (específicas a histonas-OVA)-son necesarias para la pérdida de tolerancia a DNA; b) *estado basal de las células OT-II*. Transferiremos células vírgenes y células activadas *in vitro*. Este experimento es importante porque se ha propuesto que uno de los factores que desencadenan la autoinmunidad es el mimetismo antigénico, donde células autoreactivas se activan por antígenos similares presentados en el contexto de una infección; c) *inmunizaciones repetidas*. Investigaremos si la pérdida de tolerancia sucede a la primera inmunización, o si se requieren de activaciones repetidas.

2. ¿Se perpetúa la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares, o se regula y desaparece? El desarrollo de autoanticuerpos después de infecciones es un fenómeno bien descrito (Barzilai et al., 2007), pero en individuos sanos los autoanticuerpos desaparecen espontáneamente. Asimismo, la inyección de células apoptóticas a ratones causa la aparición de AANs que desaparecen al cabo de 2 o 3 semanas. Evaluaremos si la presencia de células T específicas a histonas permite la perpetuación de la respuesta autoinmune.

3. ¿Se desarrollan manifestaciones autoinmunes tras la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares? Estudios epidemiológicos han mostrado que la pérdida de tolerancia en pacientes con LEG sucede de manera paulatina, años antes de la aparición de las manifestaciones clínicas. Esto sugiere que la presencia de autoanticuerpos no es suficiente para el desarrollo de inmunopatología. Si logramos inducir una respuesta autoinmune sostenida, investigaremos la presencia de manifestaciones asociadas, en particular glomerulonefritis y dermatitis.

8. Metodología: Criterios de selección

No aplica

9. Metodología: Desenlaces y variables

No aplica

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIOS INDIRECTOS:

RIESGOS:

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas

Barzilai, O., et al. (2007). Curr. Opin. Rheumatol. 19, 636-643.

Fraser, S.T., et al. (2005). Genesis. 42, 162-171.

Mohan, C., et al. (1993). J. Exp. Med. 177, 1367-1381.

Robertson, J.M., et al. (2000). J. Immunol. 164, 4706-4712.

Schnitzler, G.R. (2001). Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 21:Unit 21.5

van Es, J.H., et al. (1991). J. Exp. Med. 173, 461-470.

Varner, M.W., (1991). Semin. Perinatol. 15, 238.

Winkler, T.H., et al. (1992). Eur. J. Immunol. 22, 1719-1728.

Yurasov, S., et al. (2005). J. Exp. Med. 201, 703-711.

**Generación de Suero Nefrotóxico en Conejo para el Establecimiento de un
Modelo de Nefritis Inducida por Anticuerpos Anti-Membrana Basal
Glomerular en ratones C57BL/6**

Investigadores:

Dra. Florencia Rosetti Sciutto¹
M.V.Z. Mariela Guadalupe Contreras Escamilla²

Estudiantes:

OE

¹ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

² Departamento de Investigación Experimental y Bioterio, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

³ Programa de Estudios Combinados en Medicina, Facultad de Medicina, UNAM

⁴ Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, Facultad de Química, UNAM

Introducción

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune crónica que causa importante morbilidad y mortalidad. Desde el punto de vista fisiopatogénico, el LEG se desarrolla en dos fases: a) una fase inicial, en la que existe pérdida de tolerancia a antígenos ubicuamente expresados, en particular a ácidos nucleicos y proteínas asociadas; b) una fase subsecuente en la que complejos inmunes derivados de la asociación de autoanticuerpos y autoantígenos se depositan en vasos susceptibles (e.g. glomérulos renales) en donde instigan inflamación (1).

Uno de los objetivos de nuestro laboratorio es estudiar las diferencias genéticas que, a través de promover o evitar cascadas inflamatorias específicas, modifican el fenotipo clínico de los pacientes. Por ejemplo, se sabe que virtualmente todos los pacientes con LEG tienen complejos inmunes depositados en los glomérulos renales (2), pero solo el ~40% desarrollan inflamación clínicamente significativa (3). Esto indica que existen factores intrínsecos al paciente que modulan la respuesta inflamatoria a los complejos inmunes.

En un trabajo previo, demostramos en un modelo murino, que la integrina Mac-1 juega un papel protector contra el desarrollo de inflamación glomerular inducida por complejos inmunes (4). Este concepto es de gran importancia, puesto que un polimorfismo en el gen que codifica para la cadena alfa de Mac-1 (*ITGAM*) causa una mutación en la proteína que disminuye su función (5). Así, un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) asociado a LEG en estudios genéticos contribuye al desarrollo de nefritis a través de facilitar la respuesta inflamatoria inducida por complejos inmunes (6).

Con el fin de estudiar el efecto que otros factores genéticos ejercen sobre la inflamación renal inducida por complejos inmunes, es necesario para nosotros estandarizar el modelo de nefritis autoinmune experimental. Este modelo, en el que se inyecta suero de conejo inmunizado con glomérulos murinos a ratones sensibilizados contra inmunoglobulinas de conejo, ha sido ampliamente utilizado por nuestro laboratorio y por otros, para estudiar las cascadas inflamatorias en el glomérulo (7).

En este proyecto, se propone la generación de un suero anti-glomerulo de ratón, producido en conejos, que se usará como herramienta en trabajos futuros.

Objetivos

Objetivo general

Generar suero con capacidad nefrotóxica como herramienta para estudios futuros.

Objetivos específicos

1. Obtener glomérulos de ratones C57BL/6.

2. Inmunizar tres conejos con un lisado de proteínas glomerulares (de ratones C57BL/6).
3. Demostrar y titular la capacidad nefrotóxica del suero obtenido.

Hipótesis

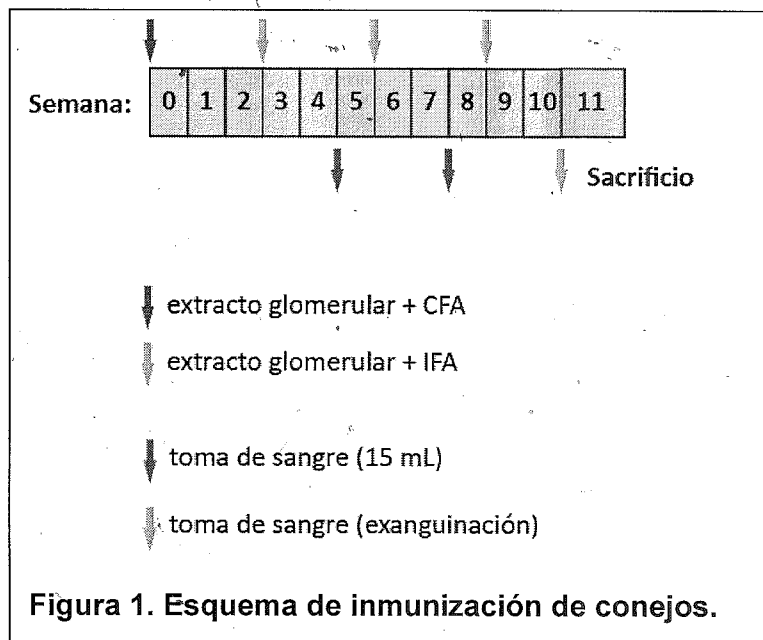
Dado que este no es un protocolo experimental, no se ha planteado una hipótesis.

Métodos

1. Obtención de glomérulos de ratones. Se aislarán los glomérulos mediante centrifugación a través de gradientes de densidad (8). Veinte ratones (indistinto machos y hembras) serán anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón. Se separarán las cortezas, se cortarán en trozos de 1 mm³ y se digerirán en colagenasa (1 mg/mL de colagenasa A, 100 U/mL de desoxirribonucleasa I, en PBS) a 37° C durante 30 minutos con agitación suave. El tejido digerido se presionará suavemente a través de un filtro de 100 µm y se centrifugará a 185 g. El lavado se repetirá 3 veces. El botón se resuspenderá en 3 mL de una solución de Ficoll (27%) y se mantendrá a 4° C. Se añadirán concentraciones decrecientes de Ficoll (2 ml, 23%; 2 ml, 20%; y 3 ml, 11%) para obtener un volumen total de 10 mL de gradiente. Se centrifugará a 1150 g durante diez minutos. Se recogerá el tejido de la interfase 20-11 y se lavarán con PBS. Se corroborará la presencia de glomérulos mediante microscopía.
2. Obtención de lisados glomerulares. El material obtenido en el paso anterior se sonicará en PBS. Una vez obtenido el lisado, las proteínas se cuantificarán mediante reacción de Bradford.
3. Inmunización de conejos. Se formará una emulsión con 50 mg de extractos glomerulares y 250 µL de adyuvante completo de Freund (CFA). La mezcla se inyectará por vía subcutánea a tres conejos (indistinto machos o hembras). Tres semanas después, se administrará un booster (50 mg de extractos glomerulares en adyuvante incompleto de Freund). En total se administrarán 3 boosters a cada conejo (**Figura 1**).
4. Obtención de suero inmune. Dos semanas después de la administración de cada booster, se obtendrá una muestra de sangre de cada conejo (15 mL, por venopunción a través de la oreja). Dos semanas después del último booster, los conejos serán anestesiados y exanguinados por punción cardiaca (**Figura 1**). El suero se separará por centrifugación y se juntará el suero de todas las tomas, de los tres conejos. Se incubará a 56° C durante 1 hora para inactivar

el complemento. Se esterilizará por filtración y se guardarán alícuotas de 0.5 mL a -80° C.

5. Análisis del potencial nefrotóxico del suero. Se realizará un ensayo de nefritis autoinmune experimental como hemos realizado en trabajos previos (4, 9, 10, 11). Primero, se sensibilizará a los ratones (hembras) con IgG de conejo. Para esto, se inmunizarán con IgG de conejo en CFA, en la pata izquierda (cojinete). La inyección se realizará por vía subcutánea, con 10 μ L de CFA+IgG de conejo. Tres días después, los ratones recibirán una dosis de suero nefrotóxico por vía intravenosa. Se probarán tres diferentes dosis de suero, 50, 100 o 200 μ L. Se incluirá un grupo que recibirá la preinmunización pero no el suero nefrotóxico. Se colectará orina los días 0 (antes de la inyección de suero), 7, 14 y 21 para medir albúmina y creatinina. El día 21, los ratones serán sacrificados (mediante una inyección i.p. de pentobarbital sódico, 40 mg/kg y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón). Se obtendrán los riñones para análisis histopatológico. Este experimento permitirá determinar cuál es la menor dosis de suero nefrotóxico capaz de inducir el efecto que deseamos: promedio de 3×10^2 Alb/Cre en orina y una calificación que alcance al menos 4 en la escala de daño que utilizaremos (12). Esta escala incluye la evaluación de proliferación endocapilar, infiltración leucocitaria y presencia de media lunas.



Referencias

1. Crispín, J. C., S.-N. C. Liossis, K. Kis-Toth, L. a Lieberman, V. C. Kyttaris, Y.-T. Juang, and G. C. Tsokos. 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol. Med.* 16: 47–57.
2. Zabaleta-Lanz, M. E., L. E. Muñoz, F. J. Tapanes, R. E. Vargas-Arenas, I. Daboin, Y. Barrios, J. a Pinto, and N. E. Bianco. 2006. Further description of early clinically silent lupus nephritis. *Lupus* 15: 845–851.
3. De Zubiria Salgado, A., and C. Herrera-Diaz. 2012. Lupus nephritis: An overview of recent findings. *Autoimmune Dis.* 1.
4. Rosetti, F., N. Tsuboi, K. Chen, H. Nishi, T. Hernandez, S. Sethi, K. Croce, G. Stavrakis, J. Alcocer-Varela, D. Gómez-Martin, N. van Rooijen, V. C. Kyttaris, A. H. Lichtman, G. C. Tsokos, and T. N. Mayadas. 2012. Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. *J. Immunol.* 189: 3714–23.
5. Rosetti, F., Y. Chen, M. Sen, E. Thayer, V. Azcutia, J. M. Herter, F. W. Luscinskas, X. Cullere, C. Zhu, and T. N. Mayadas. 2015. A Lupus-Associated Mac-1 Variant Has Defects in Integrin Allostery and Interaction with Ligands under Force. *Cell Rep.* 10: 1655–1664.
6. Crispín, J. C., C. M. Hedrich, and G. C. Tsokos. 2013. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9: 476–84.
7. Mohan, C., and C. Puttérman. 2015. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat. Rev. Nephrol.* 11: 329–341.
8. Norgaard, J. O. 1976. A new method for the isolation of ultrastructurally preserved glomeruli. *Kidney Int.* 9: 278–285.
9. Crispín, J. C., S. a Apostolidis, F. Rosetti, M. Keszei, N. Wang, C. Terhorst, T. N. Mayadas, and G. C. Tsokos. 2012. Cutting edge: protein phosphatase 2A confers susceptibility to autoimmune disease through an IL-17-dependent mechanism. *J. Immunol.* 188: 3567–71.
10. Koga, T., C. M. Hedrich, M. Mizui, N. Yoshida, K. Otomo, L. A. Lieberman, T. Rauen, J. C. Crispín, and G. C. Tsokos. 2014. CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM- α underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J. Clin. Invest.* 124: 2234–2245.
11. Venkatesh D, Hernandez T, Rosetti F, Batal I, Cullere X, Luscinskas FW, Zhang Y, Stavrakis G, García-Cardena G, Horwitz BH, Mayadas TN. Endothelial TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon- β autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity.* 38(5):1025-37.
12. Duffau, P., J. Seneschal, C. Nicco, C. Richez, E. Lazaro, I. Douchet, C.

Bordes, J. F. Viillard, C. Goulvestre, J. L. Pellegrin, et al, 2010. Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2: 47ra63.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA: 1537
FOLIO DE REGISTRO: IRE-1537-15/18-1

Fecha de registro del Protocolo:

Título del Protocolo:
Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica

Propuesta: a) Nueva

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Florencia Rosetti Sciutto
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Inmunología y Reumatología
Teléfono	54870900 ext 2610
Correo electrónico	florencia.rosettis@incmnsz.mx

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Florencia Rosetti Sciutto	ICMNSZ	Doctorado	54870900 ext 2610	florencia.rosettis@incmnsz.mx
José Carlos Crispín Acuña	ICMNSZ	Doctorado	54870900 ext 2610	carlos.crispina@incmnsz.mx
Jorge Alcocer Varela	ICMNSZ	Doctorado	0	0

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	Agosto 2015		
Fecha tentativa de finalización.	Agosto 2018		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un modelo murino que permita identificar los elementos que operan a nivel de las células CD4 para evitar que células B autoreactivas inicien respuestas autoinmunes patológicas.

Con este fin: a) generaremos histonas modificadas genéticamente para expresar el epítipo de ovoalbúmina (OVA) que reconocen las células OT-II; b) crearemos líneas celulares que expresen de manera estable e incorporen a la cromatina la histona-OVA; c) demostraremos la inmunogenicidad de la proteína quimérica en ratones; d) estudiaremos en qué condiciones las células OT-II son capaces de promover respuestas inmunes en contra de autoantígenos intranucleares, en particular DNA e) evaluaremos la función, en este modelo, de moléculas involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, en particular PD1 y PDL1.

- 3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Los modelos murinos de lupus han sido muy útiles para estudiar los mecanismos de daño a órganos blanco. Sin embargo, no son adecuados para el estudio de los eventos iniciales de pérdida de tolerancia. La gran mayoría consisten en enfermedades murinas similares al lupus (desarrollo de AANs, depósito de complejos inmunes, glomerulonefritis) que son promovidas por muchos genes, en gran parte desconocidos. En estos modelos, la pérdida de tolerancia sucede en etapas tempranas y, como en los pacientes humanos, es guiada por células de identidad y especificidad desconocidas.

Con el fin de estudiar a detalle las características de la célula T CD4 que participa en la pérdida de tolerancia hacia antígenos intranucleares, propongo el desarrollo de un modelo basado en la presencia de células T CD4 con un TCR conocido, dirigido en contra de un epítipo de histona. El desarrollo de este modelo implica desafíos técnicos, que incluyen la identificación y expansión de células T específicas a histonas, la clonación del TCR y su expresión en ratones en forma transgénica, la idoneidad del TCR clonado y la posibilidad de que al expresarlo en ratones las células sean eliminadas por selección negativa. Para abordar el desarrollo de este modelo, contemplo una estrategia experimental que aprovechará la existencia de un TCR transgénico disponible y muy bien estudiado (OT-II) y me enfocaré en la generación de histonas modificadas genéticamente para expresar el epítipo específico que reconoce el TCR OT-II.

Se generar líneas celulares que expresen en forma estable histonas genéticamente modificadas. Para inducir una respuesta anti-DNA con ayuda de células T CD4 de especificidad conocida (OT-II), incorporaré a una histona el epítipo que reconoce el TCR OT-II (AAHAEINEA)

Con el propósito de evaluar si las histonas que expresan el péptido de OVA, son capaces de inducir una respuesta inmune específica, se utilizarán ratones C57BL/6 y células T CD4 obtenidas de ratones de la misma cepa pero que expresan el TCR transgénico OT-II. Aislaremos células T CD4 de ganglios linfáticos de ratones OT-II e inyectaremos 2×10^6 células por vía intravenosa a ratones C57BL/6 (las inyecciones se harán en las venas de la cola, en un volumen total menor a $200 \mu\text{L}$). Dos días después, los ratones serán inmunizados subcutáneamente con extractos nucleares quiméricos o control en presencia de un adyuvante (adyuvante completo de Freund o Alum; $100 \mu\text{L}$). Tres, 7, 14 y 21 días después de la inmunización, se sacrificarán los ratones y se colectarán los bazo para ser analizados. Mediremos la expansión de células OT-II (número de células por bazo), su proliferación (antes de ser inyectadas se marcarán con CFSE) y su expresión de marcadores de activación (CD44). Se distinguirán las células OT-II de las células CD4 nativas por medio de un anticuerpo monoclonal que reconoce el TCR OT-II y con un marcador congénico (CD45.1).

Posteriormente se investigarán los elementos que regulan la tolerancia a antígenos intranucleares.

El desarrollo de histonas quiméricas capaces de estimular a células T CD4 de especificidad conocida nos permitirá contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Se producen anticuerpos anti-DNA tras la activación de células T CD4 que reconocen histonas? Inmunizaremos ratones con el protocolo optimizado y evaluaremos el desarrollo de AANs incluyendo



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

anticuerpos anti-DNA. Como control, inmunizaremos con nucleosomas tratados con DNAsa y con nucleosomas nativos (sin el péptido derivado de OVA). Investigaremos el efecto de varios parámetros incluyendo: a) *frecuencia de células OT-II*. Variar el número de células transferidas, nos permitirá evaluar cuántas células T autoreactivas (específicas a histonas-OVA) son necesarias para la pérdida de tolerancia a DNA; b) *estado basal de las células OT-II*. Transferiremos células vírgenes y células activadas *in vitro*. Este experimento es importante porque se ha propuesto que uno de los factores que desencadenan la autoinmunidad es el mimetismo antigénico, donde células autoreactivas se activan por antígenos similares presentados en el contexto de una infección; c) *inmunizaciones repetidas*. Investigaremos si la pérdida de tolerancia sucede a la primera inmunización, o si se requieren de activaciones repetidas (únicamente la primera inmunización se realizará en presencia de adyuvante); d) *papel de moléculas de coestimulación negativa*.Cuál es el papel de PD1 y PDL1 en la inducción de esta respuesta.

2. ¿Se perpetúa la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares, o se regula y desaparece? El desarrollo de autoanticuerpos después de infecciones es un fenómeno bien descrito (Barzilai et al., 2007), pero en individuos sanos los autoanticuerpos desaparecen espontáneamente. Asimismo, la inyección de células apoptóticas a ratones causa la aparición de AANs que desaparecen al cabo de 2 o 3 semanas. Evaluaremos si la presencia de células T específicas a histonas permite la perpetuación de la respuesta autoinmune.

3. ¿Se desarrollan manifestaciones autoinmunes tras la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares? Estudios epidemiológicos han mostrado que la pérdida de tolerancia en pacientes con LEG sucede de manera paulatina, años antes de la aparición de las manifestaciones clínicas. Esto sugiere que la presencia de autoanticuerpos no es suficiente para el desarrollo de inmunopatología. Si logramos inducir una respuesta autoinmune sostenida, investigaremos la presencia de manifestaciones asociadas, en particular glomerulonefritis y dermatitis.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría D: Por el uso de adyuvantes

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio:

Se estima que se necesitarán en total 400 ratones para realizar el proyecto. Esto incluye ratones receptores de células efectoras y ratones de los cuales se obtendrán las células.

Establecimiento del modelo. Estimamos que se necesitarán 160 ratones C57BL/6 para establecer el modelo. Se evaluarán los siguientes grupos de ratones:

Grupo	Inmunización
Experimental 1	H3-OVA aminoterminal
Experimental 2	H3-OVA carbixiloterminal
Experimental 3	H4-OVA aminoterminal
Experimental 4	H4-OVA carbixiloterminal
Control 1	Histonas nativas
Control 2	Solo adyuvante

La respuesta a las inmunizaciones será evaluada en 3 momentos (días 7, 14 y 21 post-inmunización). Además, se incluirá un grupo basal, día 0 (5 ratones) como referencia. Se espera una respuesta heterogénea a las inmunizaciones. Para calcular el número de ratones necesarios en cada grupo, hemos recurrido al artículo de Mevorach et al. (J Exp Med, 1998) en donde se evaluó la producción de anticuerpos antinucleares en ratones C57BL/6 en respuesta a la inyección de timocitos apoptóticos. En dicho reporte se usaron 8 ratones por grupo y se



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

encontró que aproximadamente el 50% de los animales desarrollaban autoanticuerpos. Asumiendo una distribución semejante, hemos decidido incluir a 8 ratones por grupo. Así, tenemos que 8 ratones por grupo X 6 grupos X 3 tiempos de análisis = 144 ratones + 6 ratones del grupo basal = 150 ratones. Además, aproximadamente 10 ratones serán utilizados para la obtención de fibroblastos de embriones que posteriormente se mantendrán en cultivo. En resumen, el establecimiento del modelo requerirá de 160 ratones.

150 ratones C57BL/6.OTII serán utilizados para obtención de células que serán transferidas a los animales experimentales y adicionalmente se utilizarán para estudios de activación celular y caracterización de las respuestas inmunes *in vitro*.

Una vez establecido el modelo y las condiciones óptimas de activación celular, se evaluará la función de las moléculas coestimuladoras negativas en este modelo, así como en estudios *in vitro*. Para esto, se obtendrán células CD4 OTII de ratones **PD1^{-/-}.OTII o se utilizarán ratones PD1L^{-/-} como animales receptores de células OTII**. Por este motivo, solicitamos **20 ratones** de cada una de éstas cepas.

Para el mantenimiento de éstas 4 colonias (C57BL/6, C57BL/6.OTII, PD1^{-/-}.OTII y PD1L^{-/-}), por tres años, se requieren **50 ratones como pie de cría**, los cuales incluyen hembras y machos.

La M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio del INCMNSZ nos aprobó espacio en el bioterio, donde nos darán apoyo técnico (limpieza de jaulas, cambio de cama, agua y comida). Nosotros nos haremos responsables de la producción y genotipificación de los ratones.

Los ratones OTII serán comprados de The Jackson Laboratories, ME, USA. Los cuales cuentan con certificado microbiológico y podrán ser aceptados en el bioterio sin la necesidad de pasar por cuarentena. Ratones C57BL/6.PD1^{-/-} y PDL1^{-/-} se encuentran actualmente en el bioterio del Instituto Investigaciones Biomédicas. Para poder ingresar a estos ratones a nuestro bioterio, se requerirá del paso por cuarentena y el certificado de salud del bioterio de donde provienen (IIB, UNAM).

- 6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.

Se espera que no sea necesario movilizar a los ratones fuera del bioterio durante el periodo experimental. En el momento del sacrificio de los ratones se movilizarán al laboratorio ubicado dentro del Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ. Para esto, se llevarán cargados en las cajas correspondientes directamente del Bioterio al laboratorio.

- 7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Todas las cepas de ratones que serán utilizadas se encuentran en el background genético C57BL/6.

OTII: Son ratones transgénicos que cuentan con las cadenas transgénicas α y β del TCR. Es un transgen que permite la selección de células CD4 que reconocen un péptido derivado de ovalbúmina (OVA) de manera específica.

PD1^{-/-}: Estos ratones son deficientes de la molécula de coestimulación negativa PD1 que se expresa en células T. Estos ratones no desarrollan enfermedad de manera espontánea y



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

no se encuentran inmunosuprimidos.

PDL1-/-: Estos ratones son deficientes de la molécula de coestimulación negativa PDL1 que se expresa en células presentadoras de antígenos. Estos ratones no desarrollan enfermedad de manera espontánea y no se encuentran inmunosuprimidos.

Programa de Producción de cepas y Reproducción:

C57BL/6.OTII x C57BL/6.OTII:

La línea experimental cuenta con 2 transgenes (cadena alfa y cadena beta).

Ratones necesarios: 150 ratones experimentales C57BL/6.OTII

Se espera que 100% de la cría tenga al menos una copia de cada transgen.

Asumiendo que se obtendrán 5 ratones de cada embarazo y cada hembra se podrá embarazar 8 veces al año, se esperan 40 crías / pareja / año.

De los ratones que se generen de estas cruza, se mantendrán las hembras para uso experimental, y únicamente cuando se requieran machos para mantener los pie de crías se seleccionarán éstos. Los demás serán sacrificados.

Aproximadamente 50% de las crías serán hembras. Por esto se requerirán aproximadamente 3 hembras y un macho por año como pie de cría y para mantener la colonia.

C57BL/6.OTII.PD1-/-

La línea experimental cuenta con 2 transgenes (cadena alfa y cadena beta del TCR, OTII) y un gen modificado (PD1 KO).

Estos ratones serán generados a partir de:

C57BL/6.OTIIalfa+beta+ x C57BL/6.PD1-/-.

Para asegurarnos que tengamos ratones que puedan ser usados para producir la siguiente generación cruzaremos 1 macho con 3 hembras.

De éstos obtendremos:

F1: 100% PD1+/-, 50% OTIIalfa+, 50% OTIIbeta+

Se seleccionarán ratones que sean OTIIalfa+beta+.PD1+/- (se estima que serán el 25% de los ratones generados) para producir la siguiente generación.

OTIIalfa+beta+.PD1+/- x OTIIalfa+beta+.PD1+/- (1 macho y 3 hembras, si se obtienen)

F2: 25% OTIIalfa+beta+.PD1-/-, 25% OTIIalfa+beta+.PD1+/+ y 50% OTIIalfa+beta+.PD1+/-.

Se seleccionarán los OTIIalfa+beta+.PD1-/- como pie de cría y el resto serán sacrificados.

Ratones necesarios: 20 ratones experimentales C57BL/6.OTII. PD1-/-.

100% de la cría se espera que sea homocigota a OTII y PD1.

Asumiendo que se obtendrán 5 ratones de cada embarazo y cada hembra se podrá embarazar 8 veces al año, se esperan 40 crías / pareja / año.

De los ratones que se generen de estas cruza, se mantendrán las hembras para uso experimental, y únicamente cuando se requieran machos para mantener los pie de crías se seleccionarán éstos. Los demás serán sacrificados.

Aproximadamente 50% de las crías serán hembras. Por esto se requerirán aproximadamente 2 hembras y un macho por año como pie de cría, para obtener los ratones experimentales y mantener la colonia.

C57BL/6.PDL1-/- x C57BL/6.PDL1-/-:

La línea experimental cuenta con un gen modificado (PDL1).

Ratones necesarios: 20 ratones experimentales C57BL/6.PDL1-/-.

100% de la cría se espera que sea homocigota a PDL1-/-.

Asumiendo que se obtendrán 5 ratones de cada embarazo y cada hembra se podrá embarazar 8 veces al año, se esperan 40 crías / pareja / año.

De los ratones que se generen de esta criza, se mantendrán las hembras para uso experimental, y únicamente cuando se requieran machos para mantener los pie de crías se seleccionarán éstos. Los demás serán sacrificados.

Aproximadamente 50% de las crías serán hembras. Por esto se requerirán aproximadamente 2 hembras y un macho por año como pie de cría y para mantener la colonia.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
C57BL/6 (ratones experimentales)	150	20-22g	8-10 semanas	Hembras
C57BL/6.OTII (donadores de células)	150	20-22g	8-10 semanas	Hembras
C57BL/6 (para obtención de fibroblastos de embriones murinos)	10	20-25g	8-16 semanas	Hembras
C57BL/6 PD1-/- .OTII (donadores de células)	20	20-25g	8-16 semanas	Hembras
C57BL/6 PD1L-/- . (ratones experimentales)	20	20-25g	8-16 semanas	Hembras
C57BL/6, C57BL/6 OTII, C57BL/6 PD1-/- .OTII y C57BL/6 PDL1-/- . (ratones para mantener la colonia)	50	20-25g	8-30 semanas	Hembras y Machos
No. de Grupos experimentales: 6				
No. de animales por grupo: 8				
No. TOTAL DE ANIMALES: 400				

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.
 El desarrollo de daño tisular en múltiples modelos espontáneos de autoinmunidad, en particular en modelos de lupus murino, requiere de varios meses. En particular, el modelo murino de autoinmunidad espontánea, *Sle1b*, a pesar de que los ratones tienen autoanticuerpos circulantes desde las 24 semanas, tardan 8-12 meses en desarrollar nefritis. Únicamente el 20% de estos ratones desarrollan nefritis (Morel L et al., J Immunol 1997). El modelo que proponemos predecimos que presentará un fenotipo similar al *Sle1b*, por lo que estimamos que, si desarrollan pérdida de la tolerancia, el daño a órgano blanco tardará al menos, 8-12 meses en ser evidente. Así, una vez que se determinen las condiciones para inducir pérdida de tolerancia, se inducirá esta en 8 ratones de cada grupo y se evaluará el desarrollo de daño tisular al año de edad. Como en los ratones *Sle1b*, prevemos que las manifestaciones de daño tisular no serán muy prevalentes, por lo que necesitaremos de un grupo amplio de ratones (8 ratones por grupo) para poder evaluar esto con precisión.
Un total de 48 ratones permanecerán por 12 meses en el bioterio.

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.		X	Sangre 50µL cada 2 meses, a través de la vena de la cola. Orina, una vez cada 2 semanas, manual.
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	Núcleos celulares vía intravenosa
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)		X	CFA 100µL y Alum 100µL vía subcutánea – única ocasión
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

Toma de muestra para genotipificación
Se cortará una porción de la cola de los ratones (0.2-0.4cm) a las 3 semanas de edad, como fuente de DNA. Este procedimiento será realizado por Florencia Rosetti y será la responsable de la producción de las colonias.

Obtención de fibroblastos de embrión murino (MEFs):
Las hembras se colocarán con los machos y al día siguiente se buscará la presencia de *plug* como dato de coito positivo. En caso de encontrarse, las ratonas serán sacrificadas al día 13-14 post-coito bajo las condiciones establecidas en el Instituto (cámara de CO₂). Se aislarán los úteros de los cuales se obtendrán los embriones con los que se trabajará para aislar los fibroblastos.

Aislamiento de Células OTII, PD1-/- OTII:
Los ratones serán sacrificados bajo la norma institucional y se diseccionarán ganglios linfáticos y bazo para obtener células T CD4.

Inmunización de ratones y obtención de muestras:
2x10⁵ células serán inyectadas intravenosamente a ratones C57BL/6, utilizando un sujetador para roedores. Dos días después, los ratones serán inmunizados subcutáneamente con los núcleos químicos o control en presencia de un adyuvante (adyuvante completo de Freund o Alum; 100µL), éstas inyecciones se realizarán en ausencia de sedación. Tres, 7, 14 y 21 días después de la inmunización, se sacrificarán los ratones y se colectarán los bazo y ganglios linfáticos para ser analizados. En caso de confirmarse la activación de las células OTII, un grupo de ratones se mantendrá en observación y se evaluará la presencia de anticuerpos antinucleares en suero. Para esto, se colectarán 50µL de sangre a través de la vena de la cola. Este procedimiento se realizará cada 2 meses, y no requiere de someterse a efectos de anestesia. Además, a partir de la semana 20, se colectará orina de forma manual, cada 2 semanas para evaluar datos de daño renal. Esto se realizará sin alterar el estado de conciencia del roedor, ya que no es un procedimiento que cause dolor.

Florencia Rosetti y José Carlos Crispín realizarán estos procedimientos.

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No serán utilizados				
----------------------------	--	--	--	--

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

No se utilizarán agentes anestésicos.

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

No se realizarán procedimientos quirúrgicos en éstos ratones.

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

No se espera que éstos parámetros cambien significativamente en este estudio.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal	0			
b) Apariencia	0			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	0			
d) Conducta espontánea.	0			
e) Conducta provocada.	0			

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Los procedimientos que se realizarán en los ratones no se espera que causen deterioro significativo en el aspecto de los ratones. A pesar de esto, se observarán y registrarán cambios de comportamiento y apariencia de los ratones. En caso de presentarse pérdida de peso moderada (10-20%) o se encuentre afectado su comportamiento, se sacrificará al ratón y el estudio se dará por terminado. El valor que en el que se considerará punto final experimental es de 5: pérdida de peso moderada y estado general afectado).

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 1. 0 si es normal.
 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 3. 2 si está afectado
 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?
Asfixia con CO₂

17) El protocolo representa riesgo biológico?
No

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?
El destino final de todos los ratones que se utilizarán en este proyecto es la obtención de órganos para distintos análisis. De algunos se obtendrán células, de otros sueros y tejidos que se analizarán histopatológicamente. Los cadáveres serán puestos en una bolsa amarilla que tenga la leyenda "Residuo Biológico" y será colocado en el lugar de desechos biológicos para ser descartados.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Florencia Rosetti Sciutto

Nombre y firma del Investigador Responsable



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dêhesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

FORMATO DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

No. de registro CIIBH: IRE-1537-15/18-1

1. Título del proyecto

Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en autoinmunidad sistémica

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
CRISPIN ACUÑA JOSE CARLOS		Investigador asociado		
ROSETTI SCIUTTO FLORENCIA		Investigador responsable		

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

Este proyecto contempla el desarrollo de un nuevo modelo murino que permitirá analizar en un sistema in vivo qué elementos contribuyen a la pérdida de tolerancia y, por lo tanto, a la iniciación de la respuesta autoinmune.

La propuesta se presenta como el desarrollo del modelo, pero es importante enfatizar que, una vez establecido, el modelo servirá como plataforma para el estudio de moléculas asociadas a enfermedad autoinmune en estudios genéticos, clínicos, y epidemiológicos. Así, este proyecto representa el inicio de un laboratorio de estudios de enfermedades autoinmunes en el que participarán varios investigadores de los Institutos Nacionales de Salud interesados en investigar el papel que juega el sistema

inmune en la patogénesis de enfermedades humanas.

He escogido al Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) como enfermedad prototipo porque es una de las enfermedades autoinmunes sistémicas más frecuentes en población mexicana y porque el LEG es un modelo ideal para estudiar la pérdida de tolerancia y el desarrollo de daño a órganos blancos. Los pacientes con LEG montan una respuesta autoinmune crónica que se manifiesta por la aparición de anticuerpos antinucleares (AANs) que forman complejos inmunes y se depositan en lechos vasculares causando inflamación. Así, la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares representa un elemento fundamental en la patogénesis del LEG.

Por qué en pacientes con LEG se pierde la tolerancia y por qué la respuesta autoinmune se perpetúa son preguntas abiertas que aún continúan sin respuesta, en gran parte, por la falta de herramientas adecuadas. **Este proyecto desarrollará un modelo que permitirá responder estas preguntas y esclarecer qué elementos participan en la pérdida de tolerancia.**

Existe evidencia de que la respuesta autoinmune de los pacientes con LEG es un proceso guiado por células T CD4 porque los AANs exhiben marcas que sugieren que maduraron en un centro germinal: son IgG, de alta afinidad, con mutaciones somáticas en las regiones V_H (van Es et al., 1991; Winkler et al., 1992). Estudios previos han mostrado que las células T CD4 que reconocen histonas son capaces de estimular la producción de anticuerpos anti-DNA. Así, se ha propuesto un modelo en el que una célula B con un receptor autoreactivo reconoce DNA en un nucleosoma y tras endocitarlo y procesarlo, presenta un péptido derivado de histona a una célula T CD4.

Las células B y las T ensamblan su receptor a través de la combinación aleatoria de segmentos de DNA. Este proceso permite la formación de repertorios de gran diversidad, pero implica la necesidad de un proceso de selección que elimine a las células autoreactivas. A pesar de esto, en personas sanas, la frecuencia de células B autoreactivas oscila entre 5 y 20% (Yurasov et al., 2005). En pacientes con LEG, la frecuencia es aún mayor. Por otro lado, las células T se someten en el timo a un proceso de selección rigurosa que resulta en una muy baja frecuencia de células T autoreactivas, tanto en sujetos sanos como en pacientes con LEG (van Es et al., 1991).

Esto sugiere que el repertorio de células B se controla en una forma menos rigurosa que el de células T, probablemente para permitir un nivel de diversidad máximo. El hecho de que en condiciones normales esto no conduzca a autoinmunidad, implica que existen mecanismos que limitan que las células B autoreactivas se activen con antígenos propios.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

El desarrollo de un modelo murino de perdida de tolerancia, donde las células T tienen un TCR conocido, y la respuesta inmune celular es dirigida a un antígeno específico (un ep[í]tope transgenicamente expresado asociado a histonas), permitirá contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Se producen anticuerpos anti-DNA tras la activación de células T CD4 que reconocen histonas?
2. ¿Se perpetúa la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares, o se regula y desaparece?
3. ¿Se desarrollan manifestaciones autoinmunes tras la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares?

JUSTIFICACION :

Los modelos murinos de lupus han sido muy útiles para estudiar los mecanismos de daño a órganos blanco. Sin embargo, no son adecuados para el estudio de los eventos iniciales de pérdida de tolerancia. La gran mayoría consisten en enfermedades murinas similares al lupus (desarrollo de AANs, depósito de complejos inmunes, glomerulonefritis) que son promovidas por muchos genes, en gran parte desconocidos. En estos modelos, la pérdida de tolerancia sucede en etapas tempranas y, como en los pacientes humanos, es guiada por células de identidad y especificidad desconocidas.

Con el fin de estudiar a detalle las características de la célula T CD4 que participa en la pérdida de tolerancia hacia antígenos intranucleares, propongo el desarrollo de un modelo basado en la presencia de células T CD4 con un TCR conocido, dirigido en contra de un epítope de histona.

6a. Hipótesis

La expresión transgénica del epítope de células OTII en histonas permitirá a las células T CD4 OTII romper la tolerancia hacia autoantígenos nucleares.

6b. Objetivos.

General:

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un modelo murino que permita identificar los elementos que operan a nivel de las células CD4 para evitar que células B autoreactivas inicien respuestas

autoinmunes patológicas.

Específicos:

Con este fin:

- a) generaremos histonas modificadas genéticamente para expresar el epítipo de ovoalbúmina (OVA) que reconocen las células OT-II
- b) crearemos líneas celulares que expresen de manera estable e incorporen a la cromatina la histona-OVA
- c) demostraremos la inmunogenicidad de la proteína quimérica en ratones
- d) estudiaremos en qué condiciones las células OT-II son capaces de promover respuestas inmunes en contra de autoantígenos intranucleares, en particular DNA
- e) evaluaremos la función, en este modelo, de moléculas involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, en particular PD1 y PDL1.

7. Metodología: Diseño general.

Serán generadas líneas celulares que expresen en forma estable histonas genéticamente modificadas para expresar el epítipo de reconocimiento del TCR OTII.

Se generarán líneas celulares que expresen en forma estable histonas genéticamente modificadas para expresar el epítipo de reconocimiento del TCR OTII, un péptido derivado de OVA. Con el propósito de evaluar si las proteínas transgénicas son capaces de inducir una respuesta inmune específica, se utilizarán ratones C57BL/6 y células T CD4 obtenidas de ratones de la misma cepa pero que expresan el TCR transgénico OT-II (Robertson et al., 2000).

Aislaremos los núcleos de células que contengan histonas nativas o histonas quiméricas. Aislaremos células T CD4 de ganglios linfáticos de ratones OT-II e inyectaremos 2×10^6 células por vía intravenosa a ratones C57BL/6. Dos días después, los ratones serán inmunizados subcutáneamente con los nucleosomas quiméricos o control en presencia de un adyuvante (adyuvante completo de Freund o Alum). Tres, 7, 14 y 21 días después de la inmunización, se sacrificarán los ratones y se colectarán los bazo para ser analizados. Mediremos la expansión de células OT-II (número de células por bazo), su proliferación (antes de ser inyectadas se marcarán con CFSE) y su expresión de marcadores de activación (CD44). Se distinguirán las células OT-II de las células CD4 nativas por medio de un anticuerpo monoclonal que reconoce el TCR OT-II y con un marcador congénico (CD45.1).

Se optimizaremos el protocolo de inmunización: identificaremos cuál(es) histona(s) quiméricas estimulan mejor, a qué concentración, con qué adyuvante (completo de Freund vs. Alum), cuál es la cantidad óptima de células OT-II que deben ser transferidas. Así, al concluir esta sección, tendremos una o más histonas quiméricas capaces de inducir la activación de células T CD4 OT-II.

II en ratones C57BL/6.

Posteriormente investigaremos los elementos que regulan la tolerancia a antígenos intranucleares. El desarrollo de histonas quiméricas capaces de estimular a células T CD4 de especificidad conocida nos permitirá contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Se producen anticuerpos anti-DNA tras la activación de células T CD4 que reconocen histonas? Inmunizaremos ratones con el protocolo optimizado mencionado anteriormente y evaluaremos el desarrollo de AANs incluyendo anticuerpos anti-DNA. Como control, inmunizaremos con nucleosomas tratados con DNAsa y con nucleosomas nativos (sin el péptido derivado de OVA). Investigaremos el efecto de varios parámetros incluyendo: a) *frecuencia de células OT-II*. Variar el número de células transferidas, nos permitirá evaluar cuántas células T autoreactivas (específicas a histonas-OVA) son necesarias para la pérdida de tolerancia a DNA; b) *estado basal de las células OT-II*. Transferiremos células vírgenes y células activadas *in vitro*. Este experimento es importante porque se ha propuesto que uno de los factores que desencadenan la autoinmunidad es el mimetismo antigénico, donde células autoreactivas se activan por antígenos similares presentados en el contexto de una infección; c) *inmunizaciones repetidas*. Investigaremos si la pérdida de tolerancia sucede a la primera inmunización, o si se requieren de activaciones repetidas.

2. ¿Se perpetúa la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares, o se regula y desaparece? El desarrollo de autoanticuerpos después de infecciones es un fenómeno bien descrito (Barzilai et al., 2007), pero en individuos sanos los autoanticuerpos desaparecen espontáneamente. Asimismo, la inyección de células apoptóticas a ratones causa la aparición de AANs que desaparecen al cabo de 2 o 3 semanas. Evaluaremos si la presencia de células T específicas a histonas permite la perpetuación de la respuesta autoinmune.

3. ¿Se desarrollan manifestaciones autoinmunes tras la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares? Estudios epidemiológicos han mostrado que la pérdida de tolerancia en pacientes con LEG sucede de manera paulatina, años antes de la aparición de las manifestaciones clínicas. Esto sugiere que la presencia de autoanticuerpos no es suficiente para el desarrollo de inmunopatología. Si logramos inducir una respuesta autoinmune sostenida, investigaremos la presencia de manifestaciones asociadas, en particular glomerulonefritis y dermatitis.

8. Metodología: Criterios de selección

No aplica

9. Metodología: Desenlaces y variables

No aplica

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIOS INDIRECTOS:

RIESGOS:

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

- Barzilai, O., et al. (2007). *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 636-643.
- Fraser, S.T., et al. (2005). *Genesis.* 42, 162-171.
- Mohan, C., et al. (1993). *J. Exp. Med.* 177, 1367-1381.
- Robertson, J.M., et al. (2000). *J. Immunol.* 164, 4706-4712.
- Rosetti, F. et al. (2015) *Cell Reports.* 10, 1-10.
- Rosetti, F., et al. (2012). *J. Immunol.* 189, 3714-3723.
- Schnitzler, G.R. (2001). *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 21: Unit 21.5
- van Es, J.H., et al. (1991). *J. Exp. Med.* 173, 461-470.
- Varner, M.W., (1991). *Semin. Perinatol.* 15, 238.
- Venkatesh, D., et al. (2013). *Immunity.* 38, 1025-1037.
- Winkler, T.H., et al. (1992). *Eur. J. Immunol.* 22, 1719-1728.
- Yurasov, S., et al. (2005). *J. Exp. Med.* 201, 703-711.

Certificado de finalización

La Oficina para Investigaciones Extraintitucionales de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) certifica que **Florencia Rosetti** ha finalizado con éxito el curso de capacitación de NIH a través de Internet "Protección de los participantes humanos de la investigación".

Fecha de finalización: 02/26/2015

Número de certificación: 346317

26 de Marzo del 2015

DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

TÍTULO DEL
PROYECTO:

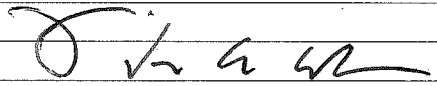
*Desarrollo de un modelo de pérdida de tolerancia de células T en
autoinmunidad sistémica*

Número de Registro
CIIBH:

IRE-1537-15/18-1

Los investigadores que participamos en el proyecto arriba mencionado sometemos voluntariamente a evaluación dicho proyecto ante el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos y libremente declaramos:

- Que conocemos todos los aspectos del estudio y contamos con la capacidad de llevarlo a buen término.
- Que la revisión minuciosa de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización y nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad.
- Que conocemos los riesgos potenciales a los que exponemos a los pacientes invitados a participar los cuales hemos discutido ampliamente con ellos.
- Que pondremos el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación por encima de cualquier otro objetivo.
- Que nos conduciremos de acuerdo con los estándares de comportamiento ético y científico aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud y el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud de México, las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la Organización Mundial de la Salud así como la Declaración de Helsinki.

Nombre del investigador	Firma
ROSETTI SCIUTTO FLORENCIA	
CRISPIN ACUÑA JOSE CARLOS	

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- D) SE TESTA NÚMERO TELEFÓNICO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**