



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 26 de agosto de 2020

No. Oficio CICUAL-086-2020
Ref. CINVA-IRE 1805

DR. JOSÉ CARLOS CRISPÍN ACUÑA
DEPTO. DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
P R E S E N T E

Estimado Dr. Crispín:

Este comité ha dictaminado que se **RECIBE Y ACEPTA** el cierre de su proyecto intitulado "MECANISMOS QUE LIMITAN LA DURACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE LA AUTOINMUNIDAD" con clave CINVA-IRE-1805-16/20-1.

En caso de tener alguna duda o comentario, se lo haremos saber.

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN
COORDINADOR DEL COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Ccp. MVZ. Mariela G. Contreras Escamilla- Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

JABP/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 www.incmnsz.mx



2020
LEONORA VICARIO
MÉDICO-QUIRÓFANO DE LA PATRIA





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 11 de agosto del 2020

DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN
COORDINADOR DEL CICUAL
PRESENTE

Estimado Dr. Barrios:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo "Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad" con registro CINVA: IRE-1805, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE,

Dr. José Carlos Crispín

Departamento de Inmunología y Reumatología

INCMNSZ

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 www.incmnsz.mx



2020
LEONA VICARIO
REMEMERATA MADRE DE LA CONSTITUCIÓN





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

Ciudad de México, 11 de agosto de 2020

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

Coordinador
Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
INCMNSZ

REF: CINVA-1805 IRE1805-16/20-1

Estimado Dr. Barrios,

Le escribo para informar a Usted y al CICUAL los resultados del proyecto titulado *Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad* y para solicitar que se cierre el proyecto.

El objetivo general de este proyecto era evaluar la contribución de B55 β al mantenimiento de la tolerancia inmunológica y los efectos producidos por su ausencia. Como resultado de los experimentos propuestos, obtuvimos resultados que demuestran lo siguiente:

1. B55 β es una molécula clave que regula la supervivencia de las células T en estado basal y durante respuestas inmunes agudas.
2. B55 β regula la supervivencia de las células T a través de una vía de señalización en la que participan AKT, FoxO y Hrk.
3. La ausencia de B55 β se asocia con supervivencia anormalmente prolongada de células T activadas y de memoria. Lo anterior amplifica la función efectora de las células T. Dependiendo del contexto, este efecto puede facilitar el desarrollo de autoinmunidad o mejorar la respuesta de memoria inmune.

Con estos resultados se generó una publicación (que se anexa a este informe):

Rodríguez-Rodríguez N, Madera-Salcedo IK, Cisneros-Segura JA, García-González HB, Apostolidis SA, Saint-Martin A, Esquivel-Velázquez M, Nguyen T, Romero-Rodríguez DP, Tsokos GC, Alcocer-Varela J, Rosetti F, Crispin JC. Protein phosphatase 2A B55 β limits CD8 T cell lifespan following cytokine withdrawal. *J Clin Invest* 2020 Aug 4;129479. doi: 10.1172/JCI129479.

Además, los resultados antes descritos se han presentado en diversos foros nacionales e internacionales:

Congresos:

- a) Noé Rodríguez-Rodríguez, J. Alejandro Cisneros-Segura, Sokratis A. Apostolidis, Tran Nguyen, George C. Tsokos, Florencia Rosetti, José C. Crispín. B55 β Controls the Termination of Immune Responses by Modulating the Activity of Akt. **Keystone Symposia Conference on Immune Regulation in Autoimmunity and Cancer**. 26 al 30 de marzo de 2017. Whistler Conference Centre, Whistler, British Columbia, Canadá.
- b) Noé Rodríguez-Rodríguez, J. Alejandro Cisneros-Segura, Jorge Alcocer-Varela, Florencia Rosetti, José C. Crispín. B55 β controla la supervivencia de linfocitos T activados mediante la modulación de la vía AKT-FoxO-HRK. **XXII Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud**. 18 al 21 de octubre de 2017, San Juan del Río, Querétaro.
- c) Noé Rodríguez-Rodríguez, J. Alejandro Cisneros-Segura, Sokratis A. Apostolidis, Marcela Esquivel-Velázquez,

Tran Nguyen, George C. Tsokos, Jorge Alcocer-Varela, Florencia Rosetti, José C. Crispín. PP2A B55 β limits the lifespan of self-reactive and pathogen-specific CD8 T cells through the pro-apoptotic molecule Hrk. **XII Congress of the Latin American Association of Immunology – ALAI**. 14 al 18 de mayo de 2018, Cancún, Quintana Roo.

Conferencias:

- a) José C. Crispín. B55 β controls the termination of immune responses by modulating Akt activity. Abril de 2017. **Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.**
- b) José C. Crispín. B55 β controls the termination of immune responses by modulating Akt activity. Abril de 2017. **Centro de Genómica e Investigación Oncológica Pfizer, Universidad de Granada, Granada, España.**
- c) José C. Crispín. HRK as a novel regulator of T cell activation in autoimmunity and cancer. **Avanzando las Ciencias Médicas a través de la Investigación Multidisciplinaria**. 7 al 8 de junio de 2018, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México.
- d) José C. Crispín. Regulación de la respuesta inmune por la fosfatasa PP2A. 12 de junio de 2020. **Seminario Institucional, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad de México.**

Finalmente, generaron una tesis de licenciatura y recibieron un premio:

Tesis: José Alejandro Cisneros Segura. Papel de B-beta en la activación y en la adquisición de funciones efectoras de células T. **Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**, Facultad de Química, UNAM. Tutor: José C. Crispín.

Premio: Primer lugar en la categoría de investigación biomédica en el XXII Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud. 18 al 21 de octubre de 2017, San Juan del Río, Querétaro

Evidencia de los productos enlistados se anexa a este informe.

Le agradezco su atención y le envío un saludo cordial



José C. Crispín



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE B-BETA EN LA ACTIVACIÓN Y EN LA ADQUISICIÓN DE
FUNCIONES EFECTORAS DE CÉLULAS T**

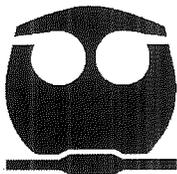
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CE



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



CONSTANCIA

A LAS INVESTIGADORES

Noé Rodríguez-Rodríguez, [REDACTED] **CE**
Jorge Alcocer-Varela, Florencia Rosetti, José C. Crispín.

POR SU SOBRESALIENTE PRESENTACIÓN EN EL
XXII ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGADORES DE LA
SECRETARÍA DE SALUD, CON EL TRABAJO

B55b controla la supervivencia de linfocitos T activados mediante la modulación de la vía AKT-FoxO-HRK.

San Juan del Río, Querétaro, del 18 al 21 de octubre de 2017.


DR. JUAN JOSÉ HICKS GÓMEZ
DIRECTOR GENERAL DE POLÍTICAS DE
INVESTIGACIÓN EN SALUD


DR. RODOLFO CANO JIMÉNEZ
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN EN SALUD



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
OFICIO FMED/BIOQ/INMUNO/JRJ/024/4/2018

ASUNTO: Semana de Inmunología.

JOSÉ CARLOS CRISPÍN ACUÑA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.
PRESENTE.

Por este medio tengo el agrado de invitarlo a participar como ponente en el evento "3a Semana de la Inmunología", que organiza el Departamento de Bioquímica, a través de las Coordinaciones de Enseñanza y Evaluación de Inmunología. El objetivo del evento es brindar un panorama general del alcance de la Inmunología en diferentes áreas de las ciencias de la salud, las cuales estarán dirigidas a estudiantes y académicos de estas áreas. Contaremos con diferentes ponencias sobre temas de vanguardia en el área, así como un concurso de carteles entre estudiantes de pregrado de las diferentes escuelas de medicina del país.

La inauguración del evento se realizará el miércoles 25 de abril a las 9:30 horas en el auditorio "Dr. Raoul Fournier Villada" de la Facultad de Medicina de la UNAM, y el evento se desarrollará del 25 al 27 de abril de 10:00 a 15:00 horas, en el mismo recinto.

Su plática se encuentra programada para el día **jueves 26 de abril**, en un horario de **10:00 a 10:50**, contando con 50 minutos para su participación, incluyendo el tiempo de preguntas por parte del público. El título de su ponencia es "**Patogénesis de enfermedades autoinmunes**".

Agradeciendo de antemano su interés en participar con nosotros en esta actividad académica, nos ponemos a su disposición para cualquier duda o situación.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 16 de marzo de 2018

Una firma manuscrita en tinta que parece decir "J. Rivera Jiménez".

DR. JESÚS RIVERA JIMÉNEZ
COORDINADOR DE EVALUACIÓN DE INMUNOLOGÍA

Freundéus², MS Cragg¹, I Teige²

¹ Antibody & Vaccine Group, Cancer Sciences Unit, University of Southampton, UK.

² BioInvent International AB, Lund, Sweden

Immunotherapy is an effective strategy for the treatment of cancer. However, these therapies are not successful for all patients, therefore more potent and targeted approaches are required. Tumours that do not respond well to therapy typically have a high proportion of immune-suppressive cell populations including regulatory T (Treg) cells. Depleting these, whilst leaving effector T cells untouched, is desirable for augmenting the efficacy of many current immunotherapy strategies. Generating antibodies towards tumour specific Treg populations is a highly attractive strategy to promote enhanced immunotherapeutic responses whilst avoiding unfavourable autoimmune complications resulting from general Treg suppression.

In an attempt to generate such reagents, a series of Treg panning strategies were undertaken using the n-CoDeR phage display library. 100's of unique antibodies were generated, converted to full IgG and further characterised. The resultant antibodies displayed specificity in 4 groups with increasing selectivity: those binding T cells, CD4+ T cells, CD4+ Foxp3 T cells and tumour specific CD4+ Foxp3 T cells. A series of *in vitro* and *in vivo* assays then further defined these mAb in their ability to delete Treg targets. Target deconvolution identified anticipated targets, such as OX40, GITR, 4-1BB and ICOS, within the active antibodies; however anticipated targets did not explain the efficacy of multiple new mAbs. Further functional and antigen characterisation will be performed to identify lead candidates that can be assessed in therapeutic model systems, before translating to humans.

17

POSTER NUMBER: 1017

MOG-specific tolerance mechanisms limit autoimmune demyelinating disease following bacterial delivery of MOG epitope

Jenny Cosby¹, Ryan Martinez¹, Brian Evavold^{1*}

¹Emory University School of Medicine, Department of Microbiology and Immunology, Atlanta, GA

*Corresponding author

Multiple mechanisms, including molecular mimicry, have been proposed to describe a relationship between infection and autoimmunity. Mimic epitopes are suspected to expand self-reactive T cells that can then target self-antigens which lead to demyelinating disease. We utilize a vaccine strain of *Listeria monocytogenes* containing myelin oligodendrocyte glycoprotein (Lm-MOG) to recapitulate the process of molecular mimicry. Use of *Listeria* as a vector allows for systemic antigen delivery, heavy bacterial burden for high antigen load, and strong T cell responses. Upon infection, myelin-specific T cells are minimally expanded (~4 times) compared to naive controls and substantially less expanded than the ~57 times which occurs upon immunization with MOG emulsified in CFA with pertussis toxin. In fact, most of the MOG specific tetramer+ T cells expanded upon infection were Tregs. To determine whether MOG specific tolerance limits disease initiation and molecular mimicry, we also investigated our infection model in a MOG deficient mouse that has altered thymic selection and an absence of MOG specific suppressive Tregs. Only in the MOG deficient mice does Lm-MOG initiate EAE with substantial numbers of MOG specific Teff upon primary infection. These data reveal two major findings: 1) MOG tolerance mechanisms are difficult to overcome and 2) deficient MOG tolerance mechanisms increase the risk for molecular mimicry induced autoimmune demyelinating disease.

18

POSTER NUMBER: 1018

B55B Controls the Termination of Immune Responses by Modulating the Activity of Akt

Noé Rodríguez-Rodríguez¹, J. Alejandro Cisneros-Segura¹, Sokratis A. Apostolidis², Tran Nguyen², George C. Tsokos², Florencia Rosetti¹, José C. Crispín^{1,2*}

¹Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, ²Beth Israel Deaconess Medical Center & Harvard Medical School, Boston.

*Corresponding author

Defective expression of B55B, a regulatory subunit of the serine/threonine phosphatase PP2A, is associated with resistance to cytokine withdrawal-induced apoptosis in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Here, we show that B55B is necessary for the contraction of activated effector CD8⁺ T cells to occur at the end of an acute immune response.

We generated OT-I mice lacking B55B (*Ppp2r2b*) in T cells (*Cd4.Cre*) from a KOMP repository-generated mouse. B55B-deficient and sufficient OT-I cells were transferred to CD45.1 mice and infected with ovalbumin-expressing

Listeria monocytogenes. We tracked the expansion and activation of the adoptively transferred OT-I cells. Clonal expansion and bacterial clearance were equivalent after transfer of B55 β -deficient and sufficient cells. However, absolute numbers of OT-I cells, in particular effector KLGR1⁺ cells and IFN- γ ⁺ cells were >3 fold increased at later time points (days 14 and 30 post-infection) in mice that received cells lacking B55, indicating the relevance of this molecule in the termination acute immune responses. In mouse and human T cells, B55 β triggered apoptosis during IL-2 deprivation by modulating the activity of Akt through its dephosphorylation at S473. The effect that B55 β exerted on Akt activity was specific and did not affect all functions of the kinase. Thus, it promoted nuclear translocation of FoxO1 and subsequent transcription of pro-apoptotic Bcl-2 family members without affecting mTOR activity. Our results reveal a novel molecule essential for the adequate termination of immune responses and unravel the mechanism by which it exerts control of activated T cells. The association of defective B55 β expression and presence of human autoimmune disease highlights the importance of this pathway.

19

POSTER NUMBER: 1019

Definition of the mechanisms behind immune activation by IMM-101 (heat killed *Mycobacterium obuense* NCTC13365): a promising, novel co-therapy for pancreatic cancer

James Crooks¹, Sheila Brown¹, Charles Ake², Laura Rosa Brunet², Andrew MacDonald¹

¹University of Manchester, Manchester, UK

²Immodulon Therapeutics LTD, London, UK

IMM-101 is a formulation of whole cell, heat killed *Mycobacterium obuense* (NCTC13365) currently entering Phase 3 clinical trial for the treatment of metastatic pancreatic cancer. In a Phase 2 trial, IMM-101 treatment of metastatic pancreatic cancer patients in combination with gemcitabine, increased median survival to 7 months, compared to 4.4 months in the gemcitabine only group (Dalglish et al., *BJC*, 2016). Pre-clinical murine experiments have also shown significant effects on tumour burden when IMM-101 is given in combination with the check point inhibitor anti-PD-1, compared to anti-PD-1 treatment alone, as well as showing an increase in the ratio of CD8⁺ effector T cells to T regulatory cells in the tumour.

We have found that IMM-101 increases the activation status of both human and murine dendritic cells (DCs) in a dose-dependent manner, and significantly increases the ability of these DCs to present antigen to CD4⁺ T cells, provoking strong IFN γ and IL-17 responses *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, even though no bioactive IL-12 was detected following DC culture with IMM-101, these DCs displayed a potent ability to generate IFN γ from a variety of cell types following transfer into naïve recipient mice. This was confirmed by showing that IL-12 deficient IMM-101 activated DCs retained the ability to generate a strong IFN γ response *in vivo*. Further, IFN γ induction by IMM-101 activated DCs did not require prior immune 'training' by environmental bacteria, as gnotobiotic and specific pathogen free mice showed equivalent responses following transfer of IMM-101 activated DCs, or following IMM-101 injection.

Improved understanding of the mechanisms behind the beneficial effects of IMM-101 may not only be important for pancreatic cancer treatment, but also for rational development of future therapies for other difficult to treat cancers.

20

POSTER NUMBER: 1020

Defects in mitochondrial biogenesis and oxidative function underlie tumor-infiltrating T dysfunction

Nicole E. Scharping¹, Ashley V. Menk¹, Rebecca S. Moreci¹, Robert L. Ferris¹, and Greg M. Delgoffe^{1*}

¹University of Pittsburgh Cancer Institute

*Corresponding author

Immunotherapy has dramatically changed the way advanced cancers are treated, resulting in durable clinical responses in a subset of patients. However, the majority of patients do not respond to immunotherapeutic approaches, likely due to other suppressive mechanisms present in the tumor microenvironment. We hypothesize that the metabolic landscape of the tumor microenvironment, nutrient poor due in part to the deregulated energetics of tumor cells and highly variable between patients, represents a major resistance mechanism to effective immunotherapy. Metabolic profiling of murine and human tumor-infiltrating T cells shows a phenotype of metabolic insufficiency, characterized by lowered glucose uptake and repressed mitochondrial mass. This repression

ORAL PRESENTATION SCHEDULE

Innate Immunity I

		Country
Chair Rommel Chacon		
Opening Lecture Bruno Rivas	Antimicrobial peptides for the treatment of tuberculosis: allies or foes.	México
Lestlie Chavez-Galan	TNFR1 modulates the recruitment of CD3+TCR α β - and CD3+TCR α β + myeloid cells to the liver after BCG infection	México
Zayda L. Piedra-Quintero	Myosin 1F promotes macrophage pro-inflammatory phenotype during colitis by controlling AKT/STAT signaling	México
Tonathiu Rodríguez	Macrophage galactose-type lectin (MGL) receptor plays a critical role in the infection against Trypanosoma cruzi	México
Dafania Cellas	Cathepsin L3 from Fasciola hepatica induces IL-18 and IL-18 secretion in a NLRP3 dependent manner on dendritic cells	Argentina
Carolina I. Serrano García	IFN-gamma regulates STAT3 activation IL-6 mediated in epithelial cells during colitis	México

Tumor Immunology

		Country
Chair Ezequiel Fuentes		
Opening Lecture Alexander Pedroza	Immunoregulatory cells in breast and liver cancer.	México
Luis Enrique Huanosta-Wurillo	NLRP3 nuclear translocation regulates IL-4 expression in patients with cutaneous lymphoma in early stage	México
Thatha Pacheco-Fernández	Macrophage migration inhibitory factor is a positive modulator of macrophage-driven-immune response in colorectal tumors at early stages of cancer progression	México
Alvaro Lladser	Vaccination-induced skin-resident CD8+ T cells mediate and broaden protective immunity against melanoma	Chile
Paola Maycotte	Autophagy regulates the secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) from Breast Cancer Cell Lines	México
Alberto Chinney-Herrera	Exosomes produced by metastatic breast cancer cells induce more angiogenesis than non-metastatic breast cancer cells in spheroid culture conditions	México

Clinical and Translational Immunology I

		Country
Chair Florencia Rosetti		
Opening Lecture Zaima Mazorra	Targeting EGFR in cancer patients: passive and active therapy.	Cuba
Leonor Huerta Hernández	Contribution of HIV patient serum antibodies that recognize lymphocyte antigens to the inhibition of the HIV-1 envelope-dependent membrane fusion	México
Nidia C. Moreno Corona	LRBA CHARACTERIZATION IN B LYMPHOCYTES	México
Glauben T. Landskron	Relationship of Interleukin 33 with metastasis-supporting events in colorectal cancer patients	Chile
Iris K. Madera-Salcedo	Hypermethylation of PPP2R2B represents a novel mechanism by which chronic inflammation perpetuates itself	México
Cristina N. Aguilar-Flores	Evaluation of plasticity features in pathogenic Th17 lymphocytes from the blood and skin of psoriasis patients	México

Immunology of Infectious Diseases I

		Country
Chair Gladys Fragoso		
Opening Lecture Susan Bueno	Immune evasion mechanisms used by Salmonella to cause systemic infections.	Chile
Joyoti Basu	The role of microRNAs in regulating autophagy and the inflammatory response during Mycobacterium tuberculosis infection	India
Luis Castillo	Human Neutrophil Response Against the Hyper-Epidemic Clone of Carbapenem Resistant Klebsiella pneumoniae ST258	Argentina
Bernardita Medel	The unfolded protein response sensor IRE-1 α modulates innate recognition and antigen presentation of melanoma tumor cells	Chile
Samira Muñoz Cruz	Identification of Giardia lamblia molecules that contribute to mast cell activation and cytokine secretion	México

T cell immunology

		Country
Chair Patricia Portales		
Opening Lecture Janette Furuzawa	Achalasia, an autoimmune disease?	México
Noe Rodríguez-Rodríguez	PP2A B55 β limits the lifespan of self-reactive and pathogen-specific CD8 T cells through the pro-apoptotic molecule Birc	México
Miguel Olivares-Aguirre	Cannabidiol suppresses human leukemic T cells via breakdown of the mitochondrial function: the role of intracellular Ca $^{2+}$	México
Sandra Ortega-Francisco	Inhibins modulate T cell activation and T effector function differentiation	México
Felipe Campos-de-Almeida	DNA DEMETHYLATING AGENTS ENHANCE CYTOLYTIC ACTIVITY RESULTING IN IMPROVED ANTI-TUMOR RESPONSE	Brasil

Neuroimmunoendocrinology

		Country
Chair Martha Legorreta		
Opening Lecture Rodrigo Pacheco	Dopamine-driven inflammation in the gut and the brain.	Chile

Tuesday, May 15th

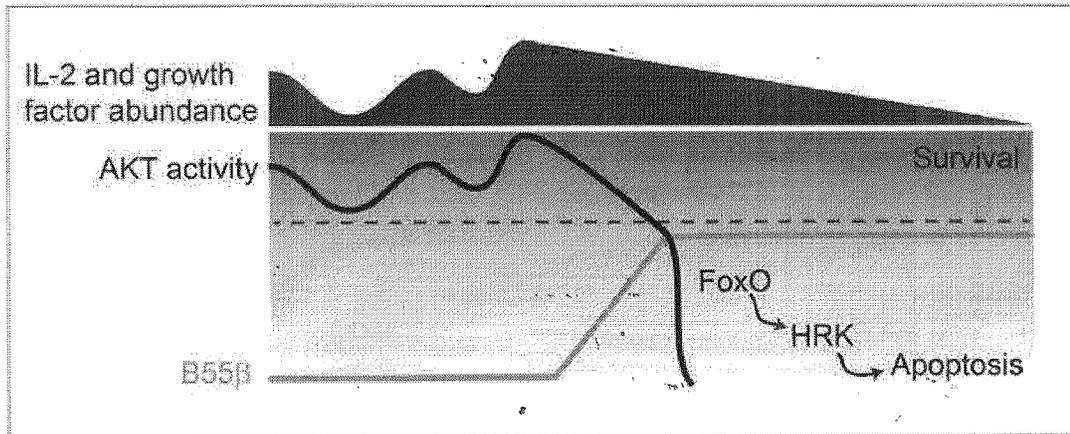
Protein phosphatase 2A B55β limits CD8 T cell lifespan following cytokine withdrawal.

Noé Rodríguez-Rodríguez, ... , Florencia Rosetti, Jose C. Crispin

J Clin Invest. 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI129479>.

Research In-Press Preview Autoimmunity

Graphical abstract



Find the latest version:

<https://jci.me/129479/pdf>



Protein phosphatase 2A B55 β limits CD8 T cell lifespan following cytokine withdrawal

Noé Rodríguez-Rodríguez,^{1,2,3,4} Iris K. Madera-Salcedo,¹ J. Alejandro Cisneros-Segura,¹ H. Benjamín García-González,¹ Sokratis A. Apostolidis,^{3,5} Abril Saint-Martin,¹ Marcela Esquivel-Velázquez,^{1,6} Tran Nguyen,³ Dámaris P. Romero-Rodríguez,⁷ George C. Tsokos,³ Jorge Alcocer-Varela,¹ Florencia Rosetti,^{1,*} and José C. Crispín^{1,8,*}

¹ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, 14080, Mexico

² Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City, 04510, Mexico

³ Division of Rheumatology, Beth Israel Deaconess Medical Center & Harvard Medical School, Boston, MA, 02215, USA

⁴ Present address: Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, CB2 0QH, UK

⁵ Present address: Division of Rheumatology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA.

⁶ Present address: Dirección de Investigación, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Mexico City, 06726, Mexico

⁷ Flow Cytometry Core Facility, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", Mexico City, 14080, Mexico

⁸ Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, NL, 64849, Mexico

Authorship note: NRR and IKMS share the first author position in this work. NRR produced 56% and IKMS 44% of the data presented in the main figures.

* Correspondence:

José C. Crispín

Departamento de Inmunología y Reumatología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Vasco de Quiroga 15
Tlalpan, 14080
Mexico City, Mexico
Phone: +5255-5487-0900 ext. 2610
carlos.crispina@incmnsz.mx

Florencia Rosetti

Departamento de Inmunología y Reumatología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Vasco de Quiroga 15
Tlalpan, 14080
Mexico City, Mexico
Phone: +5255-5487-0900 ext. 2610
florencia.rosettis@incmnsz.mx

Conflict of interest statement: The authors have declared that no conflict of interest exists.

ABSTRACT

How T cells integrate environmental cues into signals that limit the magnitude and length of immune responses is poorly understood. Here, we provide data that demonstrates that B55 β , a regulatory subunit of the phosphatase PP2A, represents a molecular link between cytokine concentration and apoptosis in activated CD8 T cells. Through the modulation of AKT, B55 β induced the expression of the pro-apoptotic molecule Hrk in response to cytokine withdrawal. Accordingly, B55 β and Hrk were both required for in vivo and in vitro contraction of activated CD8 lymphocytes. We show that this process plays a role during clonal contraction, establishment of immune memory, and preservation of peripheral tolerance. This regulatory pathway may represent an unexplored opportunity to end unwanted immune responses, or to promote immune memory.

KEYWORDS

AKT; Apoptosis; B55 β ; cytokine withdrawal; Hrk; *PPP2R2B*; PP2A; T cells.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd., Mx a 24 de julio de 2020.

No. Oficio CICUAL/050/20

DR. JOSÉ CARLOS CRISPIN ACUÑA
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA
Y REUMATOLOGÍA
Presente.

Estimado Dr. Crispín:

En atención al escrito, sin número de oficio con fecha de 10 de julio de 2019 firmado por el Dr. Jorge Alcocer Varela y que a letra dice:

“Quisiera informar al CICUAL que este proyecto fue una colaboración entre mi laboratorio y el laboratorio del Dr. Crispín y que el Dr. Crispín dirigió todos los experimentos con animales. La razón por la que yo aparezco como responsable ante el CICUAL es porque fungí como responsable técnico del proyecto ante CONACYT, dado que no admiten Co-responsables técnicos aunque los proyectos sean llevados a cabo en múltiples laboratorios. Esta aclaración la hago porque en los productos derivados de este proyecto, el Dr. Crispín aparece como autor responsable”

Le comentamos que para los documentos y trámites relacionados con el protocolo con clave CINVA-IRE-1805-16/20-1 intitulado **“MECANISMOS QUE LIMITAN LA DURACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE LA AUTOINMUNIDAD”** nos dirigiremos a usted. Es por ello que le informamos que la prórroga de dicho protocolo venció el 28 de febrero de 2020, por lo que requerimos saber si necesitará una prórroga más. En caso afirmativo, favor de enviar al CICUAL 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. En caso de no requerir prórroga se necesita que entregue el: Formato de cierre
2. Informe final
3. 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

DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN
COORDINADOR DEL COMITÉ INTERNO DE CUIDADO Y
USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

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

JABP/bdr
Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 www.incmnsz.mx



2020
LEONA VICARIO
BENEFICIA DEL DESARROLLO Y LA PAZ





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



2019
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA

CDMX., a 23 de julio de 2019

No. Oficio CICUAL-190-19

DR. JORGE CARLOS ALCOCER VARELA
Depto. de Inmunología y Reumatología
Presente.

 **ACUSE**

REF: CICUAL-IRE-1805-16/20-1

Estimado Dr. Alcocer:

Este comité ha dictaminado que se **AUTORIZA** la prórroga con vencimiento al **28 de febrero de 2020** a su proyecto intitulado **“MECANISMOS QUE LIMITAN LA DURACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE LA AUTOINMUNIDAD”**.

Sin más por el momento quedo de Usted.

Atentamente,

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán
Coordinador del Comité Interno para el Cuidado y Uso de
los Animales de Laboratorio

c.c.p. M.V.Z. Mariela Coñtreras Escamilla, Jefa del DIEB
JBP/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx

INVEST. EXPERIMENTAL
POSTERIO
DMSE
2536 15:10
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



Ciudad de México a 10 de julio de 2019

Dr. Jorge A. Barrios Payán

Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)
Coordinador

PRESENTE

Estimado Dr. Barrios,

Por este conducto quisiera solicitar al CICUAL una extensión de 6 meses, sin aumento en el número de ratones, para el proyecto titulado "Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad" (IRE-1805-16/20-1). Actualmente el trabajo se encuentra en revisión para su publicación y estamos finalizando los experimentos solicitados por los revisores. Una vez que sea aprobado el artículo para su publicación, realizaremos el cierre del proyecto y entregaremos al CICUAL un reporte de los productos derivados del mismo.

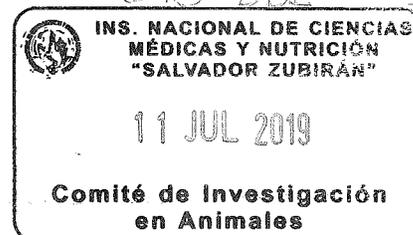
Quisiera, además, informar al CICUAL que este proyecto fue una colaboración entre mi laboratorio y el laboratorio del Dr. Crispín y que el Dr. Crispín dirigió todos los experimentos con animales. La razón por la que yo aparezco como responsable ante el CICUAL es porque yo fungí como responsable técnico del proyecto ante CONACYT, dado que no admiten Co-responsables técnicos aunque los proyectos sean llevados a cabo en múltiples laboratorios. Esta aclaración la hago porque en los productos derivados de este proyecto, el Dr. Crispín aparece como autor responsable.

Sin más por el momento y esperando que esta petición sea apropiada, quedo de usted.

Atentamente

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México, México
Tel. (52) 54 87 09 00
www.incmnsz.mx

Dr. Jorge Alcocer Varela
Responsable del proyecto





"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"



2019
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



ACUSE

Ciudad de México a 28 de junio de 2019

No. Oficio CICUAL-149-19

DR. JORGE ALCOCER VARELA
Inmunología y Reumatología
PRESENTE.

Estimado Dr. Alcocer:

Por este conducto le informo que su proyecto intitulado: "MECANISMOS QUE LIMITAN LA DURACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE LA AUTOINMUNIDAD", con registro IRE-1805-16/20-1 finalizó en febrero de 2019. 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 al CICUAL 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. En caso de no requerir prórroga se necesita que entregue el: Formato de cierre
2. Informe final
3. 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,

[Handwritten signature]
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

NABS/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx

2455 11:20
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

DMSE
INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN INCMNSZ



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

ACTISE

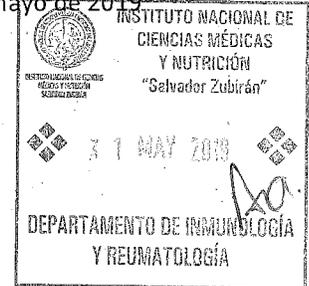


2019

AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA

Ciudad de México, a 31 de mayo de 2019

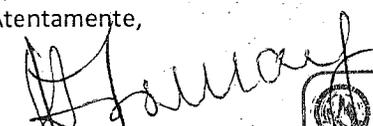
Dr. Jorge Alcocer Varela
Investigador Titular
Presente

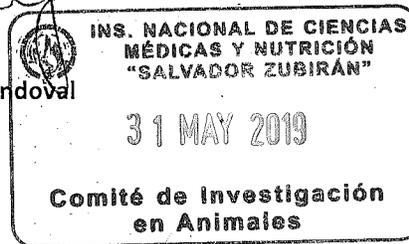


Por este medio le informo que el Comité se da por enterado del error que hubo en la solicitud de animales en la propuesta original, por lo que, después de la nota aclaratoria que nos envió se autoriza el uso de 1846 ratones para la realización del proyecto IRE-1805-16/20-1 "Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad"

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

Atentamente,


Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora del CICUAL





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 23 Mayo, 2019

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora

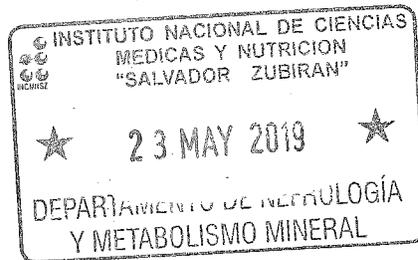
CICUAL

Estimada Dra. Bobadilla:

Escribo esta carta para hacer de su conocimiento que el *addendum* enviado el 27 de Octubre del 2017 con respecto al proyecto con IRE **1805**, titulado "Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad" tiene un error en la cuenta final del número de ratones solicitados. El número estipulado en la carta es de 1759, y debería de ser 1846 animales.

Agradezco su atención,

Dr. Jorge Alcocer Varela





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



México, CdMX., a 2 de octubre de 2018.

DR. JORGE CARLOS VARELA ÁLCO CER
Depto. INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
Presente.

REF: CINVA IRE-1805-16/20-1

Estimado Dr. Alcocer:

Este comité ha dictaminado que se **AUTORIZA** el adendum a su proyecto intitulado
**"MECANISMOS QUE LIMITAN LA DURACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y
SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE LA AUTOINMUNIDAD"**.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora del Comité Interno para el cuidado y uso de
los Animales de Laboratorio

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

NAB/nom



INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRICIÓN INCMNSZ "S.Z."

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Dominguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx



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

Ciudad de México, 1 de octubre de 2018

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora
Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales
INCMNSZ

REF: CINVA-1805 IRE1805-16/20-1

Estimada Dra. Bobadilla,

Agradezco a Usted y a los miembros del CICUAL el tiempo dedicado a revisar y discutir el Adendum con fecha de 22 de agosto de 2018, correspondiente al proyecto titulado *Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad*. A continuación la información adicional solicitada por el Comité:

Los experimentos adicionales han sido explicados en el Adendum con fecha de 22 de agosto de 2018. En lo que a los procedimientos respecta, los experimentos contemplan procedimientos ya descritos y aprobados en el proyecto original (transferencia de células por inyección intravenosa, toma de muestras de sangre de la vena caudal, infección con *Listeria monocytogenes*). La excepción es la inoculación de células de melanoma B16. Esto se realizará de acuerdo al siguiente procedimiento:

Inoculación de células de melanoma B16. Se crecerán las células en el laboratorio en medio de cultivo convencional (DMEM suplementado con SBF). Cuando las células alcancen una confluencia del ~80%, se cosecharán y lavarán dos veces en PBS estéril. Se inyectarán 0.2×10^6 células de melanoma B16-OVA (confluencia del 80%) en 100 μ L de PBS, por vía subcutánea, en el dorso derecho de ratones CD45.1 (8-12 semanas). Cada dos días se medirá el crecimiento del tumor. El tamaño del tumor se calculará mediante la siguiente fórmula, $\text{mm}^2 = \text{largo del tumor} \times \text{ancho}$. Los ratones serán evaluados en forma diaria para medir el crecimiento del tumor y para asegurar su bienestar. Se les dará punto final al día 21 después de la inyección del tumor, o antes si el tumor rebasara 1 cm^2 o se llegasen a cumplir los criterios de punto final (dichos criterios se anexaron al Adendum original).

Con respecto al segundo punto solicitado, que se utilicen los mismos ratones OT-I como donadores de ambos experimentos, le comento que esto se hará en la medida de lo posible. De cada ratón OT-I obtenemos aproximadamente 5 millones de células. En base a las células necesarias, estimamos el número de ratones necesario para cada experimento. Nunca desperdiciamos las células.

Le agradezco su atención y aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial

Dr. Jorge Alcocer Varela

dmse



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

México, CdMX., a 14 de septiembre de 2018.

DR. JORGE CARLOS VARELA ALCOCER
Depto. INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
Presente.

REF: CINVA IRE-1805-16/20-1

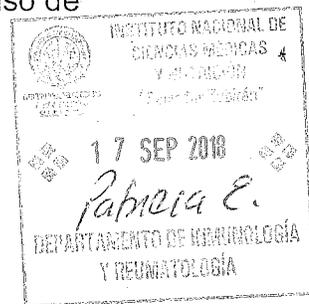
Estimada Dr.Alcocer:

Este comité ha dictaminado que el adendum que solicitó queda **PENDIENTE CON OBSERVACIONES** a su proyecto intitulado **"MECANISMOS QUE LIMITAN LA DURACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE LA AUTOINMUNIDAD"** se solicita se describan los experimentos y procedimientos a realizar en los animales solicitados, en caso de que sean diferentes a la propuesta original. Se sugiere utilizar los mismos ratones donadores para ambos experimentos propuestos, de no ser posible por favor de justificarlo.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora del Comité Interno para el cuidado y uso de los "Animales de Laboratorio



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

NAB/nom



1988 14:00
INVEST. EXPERIMENTAL Y BIOTERIO

17 SEP 2018
dmse
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx



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

Ciudad de México, 22 de agosto de 2018

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora
Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales
INCMNSZ

REF: CINVA-1805 IRE1805-16/20-1

Estimada Dra. Bobadilla,

Le escribo para informar a Usted y al CICUAL los avances del proyecto titulado *Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad* y para solicitar que se autoricen dos nuevos experimentos no contemplados en el proyecto original.

El objetivo general de este proyecto era evaluar la contribución de B55 β al mantenimiento de la tolerancia inmunológica y los efectos producidos por su ausencia. Realizamos con éxito los experimentos contemplados en el proyecto original, cuyos resultados resumo a continuación.

Generamos un ratón con deficiencia condicional de B55 β en células T. Observamos durante un año una cohorte de estos ratones (y a controles) para definir si la ausencia de B55 β en células T causaba un fenotipo espontáneo. La falta del gen causó la acumulación significativa de células T CD8⁺ con fenotipo de memoria central (CD8⁺ CD44⁺ CD62L⁺) con alta producción de IFN- γ . Para determinar si, como en células humanas, B55 β juega un papel en la inducción de apoptosis por privación de citocinas, generamos ratones con un receptor de células T (TCR) específico para ovoalbúmina (OVA) presentada por moléculas de clase I (OT-I), suficientes o deficientes en B55 β . Transferimos las células a ratones normales y los infectamos con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa OVA. Eso nos permitió analizar la expansión y la contracción de células T específicas (OT-I) durante la infección por *Listeria*. Aunque no hubo diferencias en la expansión de las células y en su capacidad de eliminar a la bacteria, las células deficientes en B55 β mostraron una deficiencia marcada en la contracción. Es decir, la inducción de apoptosis al término de la respuesta inmune aguda fue significativamente deficiente. En experimentos in vivo e in vitro, demostramos que la falta de contracción de las células T activadas se debía a apoptosis deficiente. Además probamos que la manera a través de la cual B55 β induce apoptosis en las células T privadas de citocinas es la modulación de la actividad de Akt que resulta en la activación del factor de transcripción FoxO1 y la producción de la molécula pró-apoptótica HRK. Para comprobar que HRK es el factor pro-apoptótico necesario para la inducción de apoptosis en respuesta a privación de citocinas, generamos lentivirus que codifican RNA de interferencia (shRNA) —o lentivirus control. Infectamos células T y las expandimos en presencia de IL-2. En las células infectadas con el virus control, la privación de citocinas causó apoptosis en la magnitud y con la cinética esperada. Sin embargo, el silenciamiento de HRK disminuyó significativamente la apoptosis de las células T de una manera similar a la observada en las células deficientes de B55 β . Comprobamos este fenómeno en un experimento in vivo, en el que inyectamos a ratones células CD8 infectadas con lentivirus control (que expresan un fluorocromo azul) y células CD8 infectadas con el lentivirus que silencia HRK (que expresan un fluorocromo verde). Al cabo de dos semanas sacrificamos a los ratones y medimos cuántas células azules y cuántas células verdes había en los órganos linfoides secundarios. Encontramos que la inhibición de HRK se asociaba a un incremento significativo en la supervivencia celular. En resumen, confirmamos los hallazgos preliminares que dieron pie al proyecto y descubrimos una nueva vía molecular que regula la supervivencia de las células T activadas. Asimismo, describimos por primera vez la función de la molécula HRK como un freno molecular de la respuesta inmune celular.

Los resultados antes descritos se han presentado en diversos foros nacionales e internacionales:

Congresos:

a) Noé Rodríguez-Rodríguez, J. Alejandro Cisneros-Segura, Sokratis A. Apostolidis, Tran Nguyen, George C. Tsokos, Florencia Rosetti, José C. Crispín. B55 β Controls the Termination of Immune Responses by Modulating the Activity of Akt. **Keystone Symposia Conference on Immune Regulation in Autoimmunity and Cancer**. 26 al 30 de marzo de 2017. Whistler Conference Centre, Whistler, British Columbia, Canadá.

b) Noé Rodríguez-Rodríguez, J. Alejandro Cisneros-Segura, Jorge Alcocer-Varela, Florencia Rosetti, José C. Crispín. B55 β controla la supervivencia de linfocitos T activados mediante la modulación de la vía AKT-FoxO-HRK. **XXII Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud**. 18 al 21 de octubre de 2017, San Juan del Río, Querétaro.

c) Noé Rodríguez-Rodríguez, J. Alejandro Cisneros-Segura, Sokratis A. Apostolidis, Marcela Esquivel-Velázquez, Tran Nguyen, George C. Tsokos, Jorge Alcocer-Varela, Florencia Rosetti, José C. Crispín. PP2A B55 β limits the lifespan of self-reactive and pathogen-specific CD8 T cells through the pro-apoptotic molecule Hrk. **XII Congress of the Latin American Association of Immunology – ALAI**. 14 al 18 de mayo de 2018, Cancún, Quintana Roo.

Conferencias:

a) José C. Crispín. B55 β controls the termination of immune responses by modulating Akt activity. Abril de 2017. **Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid**, Madrid, España.

b) José C. Crispín. B55 β controls the termination of immune responses by modulating Akt activity. Abril de 2017. **Centro de Genómica e Investigación Oncológica Pfizer, Universidad de Granada**, Granada, España.

c) José C. Crispín. HRK as a novel regulator of T cell activation in autoimmunity and cancer. **Avanzando las Ciencias Médicas a través de la Investigación Multidisciplinaria**. 7 al 8 de junio de 2018, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México.

Además han generado una tesis de licenciatura y han recibido un premio:

Tesis: José Alejandro Cisneros Segura. Papel de B-beta en la activación y en la adquisición de funciones efectoras de células T. **Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**, Facultad de Química, UNAM. Tutor: José C. Crispín.

Premio: Primer lugar en la categoría de investigación biomédica en el XXII Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud. 18 al 21 de octubre de 2017, San Juan del Río, Querétaro

Por último, hemos preparados manuscrito que enviamos a publicar: Noé Rodríguez-Rodríguez, J. Alejandro Cisneros-Segura, Sokratis Apostolidis, Marcela Esquivel-Velázquez, Tran Nguyen, George C. Tsokos, Jorge Alcocer-Varela, Florencia Rosetti, José C. Crispín. PP2A B55 β Controls Apoptosis in Activated T cells through a Conserved AKT-FoxO-HRK Pathway.

Después de ser evaluado en una revista, los editores consideraron que el trabajo requiere de información adicional para sustentar el papel de B55 β en la respuesta inmune normal y patológica. Por esa razón hemos diseñado dos experimentos adicionales, no contemplados en el proyecto original que describo a continuación:

1. Análisis del papel de B55 β en limitar la supervivencia de células T CD8⁺ de memoria. Se aislarán células T OT-I CD8⁺ (células T CD8 que tienen un receptor de células T que reconoce ovoalbúmina [OVA]) de ratones con el alelo silvestre o con un alelo mutado de B55 β . Se transferirá un millón de células OT-I a ratones CD45.1. Al día siguiente, los ratones se infectarán con 10,000 u.f.c. de *Listeria monocytogenes* que expresa OVA (LM-OVA o se dejarán sin infectar. Esa dosis de LM-OVA causa una infección aguda, autolimitada, que induce la expansión de las células OT-I y la generación de células OT-I de memoria. Un mes después de la infección, los ratones serán retados con un tumor que expresa OVA (melanoma B16) (Overwijk & Restifo, 2009). Para esto, se inyectarán en forma s.c. 2 x 10⁵ células en el flanco del ratón. Se espera que el crecimiento del tumor se relacione en forma inversa con la cantidad de células OT-I de memoria presentes en el ratón. Si, como

hemos propuesto, la ausencia de B55 β favorece la supervivencia de las células T CD8⁺ de memoria, los ratones que recibieron células OT-I deficientes en B55 β estarán protegidos del tumor. Los ratones serán evaluados en forma diaria para medir el crecimiento del tumor y para asegurar su bienestar. Se les dará punto final al día 21 después de la inyección del tumor, o antes si el tumor rebasara 1 cm³ o se llegasen a cumplir los criterios de punto final (se anexan dichos criterios).

2. Análisis del papel de B55 β para limitar la patogenicidad de las células T CD8⁺. Se obtendrán células esplénicas de ratones OT-I control y deficientes en B55 β . Se prepararán células citotóxicas in vitro, estimulando a las células esplénicas con SIINFEKL (el péptido derivado de OVA para el que son específicas las células OT-I), en presencia de IL-2. Al cuarto día, se aislarán las células CD8⁺ y se transferirán (2×10^5) a ratones RIP-mOVA, que expresan OVA en las células β de los islotes pancreáticos. Cuando esta transferencia se hace con células T CD8 normales, los mecanismos de tolerancia evitan la inflamación pancreática y los ratones no desarrollan ninguna enfermedad. Para determinar si la ausencia de B55 β permite a las células T CD8 escapar de dichos mecanismos, monitorizaremos la glucosa de los ratones cada 48 horas. Se dará muerte a los ratones 23 días después de la transferencia de células OT-I, o antes si desarrollan hiperglucemia (>250 mg/dL) o si cumplen con criterios de punto final humanitario. Se analizarán los páncreas en busca de inflamación.

Para los experimentos mencionados, se han calculado grupos de 5 ratones y se ha considerado hacer el experimento por triplicado. En total, se solicitan 96 ratones, distribuidos de la siguiente manera:

Exp	Cepa	Papel experimental	n	Rep	Total
1	OT-I WT	Donador de células WT	3	3	9
	OT-I B55 β KO	Donador de células KO	3		9
	CD45.1	Receptor de células	10		30
Total Exp 1			16		48
2	OT-I WT	Donador de células WT	3	3	9
	OT-I B55 β KO	Donador de células KO	3		9
	RIP-mOVA	Receptor de células	10		30
Total Exp 2			16		48
Total					96

Pensamos que, si bien los experimentos propuestos no se desvían mucho de lo propuesto originalmente, el llevarlos a cabo es necesario para establecer, de manera definitiva, el papel de B55 β en la respuesta inmune.

Le agradezco su atención y aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial



Dr. Jorge Alcocer Varela

Criterios de Punto Final del Laboratorio Crispín/Rosetti

Animal/Grupo: _____ Edad: _____ Sexo: _____

Protocolo: _____

Modelo Experimental: _____

Parámetro		Cal.	Fecha											
Apariencia	Normal	0												
	Falta general de acicalamiento	1												
	Pelo erizado	2												
	Postura encorvada, pupilas dilatadas	3												
Peso	Normal	0												
	Pérdida de 10 a 19 % del peso inicial	1												
Hidratación	Normal	0												
	Prueba de pellizco de piel positiva	1												
Conducta	Normal	0												
	Movilidad reducida. Aislado, pero alerta	1												
Respuesta a estímulos	Normal	0												
	Depresión, o exageración	1												
	Reacción violenta	2												
Signos clínicos	Frecuencia respiratoria normal	0												
	Cambios leves en frecuencia respiratoria	1												
	Respiración abdominal	2												
	Cianosis	3												
Total (0-11)*														

* 1-4 = notificar al veterinario; 5-9 = monitorear cuidadosamente; ≥ 10 = dar muerte

Criterios de punto final adicionales:

- Pérdida de ≥ 20% del peso inicial
- Encefalomiелitis alérgica experimental: Escala clínica 4
- Colitis: Prolapso rectal

Referencias:

Guía para el punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. 2005
 IACUC Guideline Humane Intervention and Endpoints for Laboratory Animal Species - Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook.

Notas:



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

ACUSE

"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución de los Estados Unidos Mexicanos"

México, D. F., a 9 de noviembre de 2017.

Dra. Jorge Alcocer Varela
~~Depto. Inmunología y Reumatología~~
Presente.

REF: CINVA-IRE-1805-16/20-1

Estimado Dr. Alcocer.

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

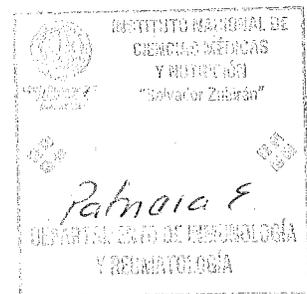
"Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular".

Este comité ha dictaminado que **SE AUTORIZA** el addendum y la **redistribución de los grupos experimentales.**

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

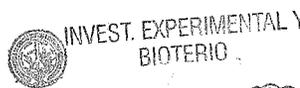
Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



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

NAB/nom



INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z."

15/11/17 9:57
DMSE



1611



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 27 de Octubre, 2017

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



Estimada Dra. Bobadilla,

Escribo este *addendum* para solicitar se me autorice realizar cambios en el proyecto y la distribución de ratones solicitados en el protocolo titulado "Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad" con REF. **CINVA 1805**.

Específicamente, el cambio que solicito se refiere a usar ratones C57BL/6 como receptores de células en vez de ratones heterocigotos para Ppp2r2b . Esto obedece a la dificultad de obtener números suficientes de ratones genéticamente modificados. Cabe recalcar, que el número total de ratones originalmente solicitado no será modificado, únicamente se solicita la aprobación para la redistribución del uso de cepas e incluir ratones silvestres. De acuerdo a lo anterior, el número de ratones genéticamente modificados que será utilizado disminuirá. Nuestra petición, resulta en los siguientes cambios en la distribución:

	Animales autorizados	Animales solicitados
C57BL6	-	1130
Ppp2r2bfl/fl.Vav-Cre	240	80
OT-II.Ppp2r2bfl/fl.Vav-Cre	180	50
OT-I.Ppp2r2bfl/fl.Vav-Cre	180	50
Ppp2r2bfl/fl.Cd4-Cre	87	87

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



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

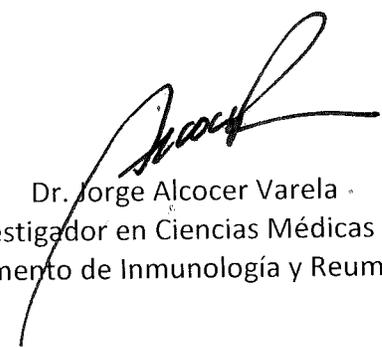
Ppp2r2bfl/fl.Cd4-Cre	87	87
OT-II.Ppp2r2bfl/fl.Cd4-Cre	180	50
OT-I.Ppp2r2bfl/fl.Cd4-Cre	180	50
Ppp2r2bfl/fl.Cd11c-Cre	90	30
OT-II.Ppp2r2bfl/fl.Cd11c-Cre	180	50
OT-I.Ppp2r2bfl/fl.Cd11c-Cre	180	50
Ppp2r2bLacZ/+	180	50
Ppp2r2bfl/fl, Vav-Cre, Cd4-Cre Cd11c-Cre, OTI, OT-II, Ppp2r2bLacZ/+ (pies de cría)	82	82
No. TOTAL DE ANIMALES:	1759	1759

1846 1846

Ratones

87

Quedo en espera de su amable respuesta,

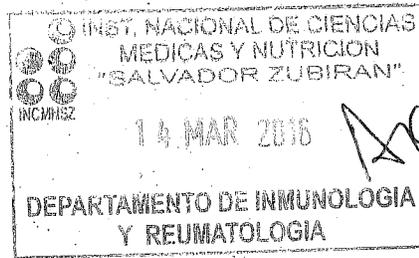

Dr. Jorge Alcocer Varela
Investigador en Ciencias Médicas "F"
Departamento de Inmunología y Reumatología

Ccd. MVZ Mariela Contreras Escamilla

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



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



México, D. F., a 11 de marzo de 2016.

Dr. Jorge C. Alcocer Varela
Depto. Inmunología y Reumatología
Presente.

REF: CINVA-1805 IRE-1805-16/20-1

Estimado Dr. Alcocer:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad”

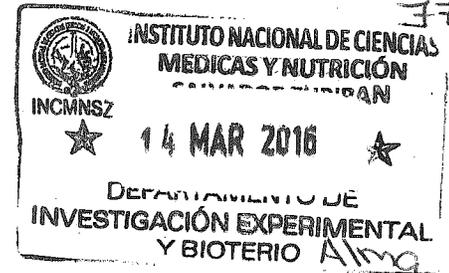
Este comité ha dictaminado **APROBARLO** y se autorizan 1677 ratones para la realización del protocolo, a reserva del espacio y equipo que tiene asignado su departamento en el en el DIEB.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

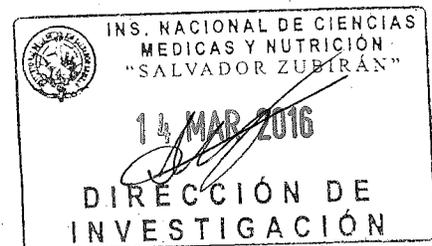
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



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

NAB/nom





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

México, D. F., a 17 de febrero de 2016

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

REF: CINVA-1805 IRE1805-16/20-1

Estimada Dra. Bobadilla,

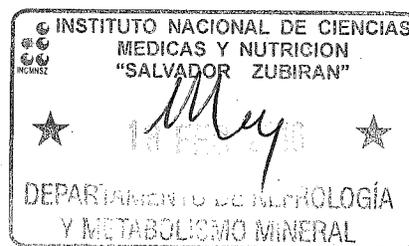
Le agradezco a Usted y a la Comisión de Investigación en Animales por la evaluación de mi Protocolo de Investigación Experimental titulado "Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de autoinmunidad". He realizado los cambios sugeridos, que se detallan a continuación:

1. Se sugiere modificar el título...
Este proyecto se ha sometido a CONACyT y ha sido aprobado en el marco de la convocatoria "Fronteras de la Ciencia". El reglamento de CONACyT solicita la aprobación del comité de investigación en animales en un protocolo con el mismo título. Por esta razón, solicito respetuosamente al CINVA no cambiar el título del proyecto.
2. En el FAEP se establece una duración de 5 años...
Se ha cambiado la duración del protocolo a 3 años en el FAEP.
3. El formato Latis está incompleto...
Se han corregido las omisiones en el formato Latis.
4. Se recomienda coordinar con la jefatura del DIEB...
Los investigadores están al tanto de las limitaciones de espacio del DIEB y realizarán este protocolo en coordinación con la jefatura del DIEB. Es importante mencionar que debido a que se usarán ratones con genética compleja, que requerirán de genotipificación; los investigadores producirán los ratones en el espacio que tienen asignado y se harán cargo de los apareamientos, separación de crías, genotipificación, etc. Por este motivo, este proyecto no representará para el DIEB una carga en términos de producción de ratones.
5. Se sugiere poner ejemplos de cambios de conducta y apariencia...
Se ha modificado el punto 15 del FAEP y se han agregado signos de malestar que se vigilarán en los ratones.
6. Se recomienda describir las normas de operación de Listeria y LCMV...
Se han incluido las normas de operación para el manejo de dichos agentes en el apartado 17 de la FAEP.
7. La sección 18 de la FAEP se especificó de manera incorrecta...
Se ha corregido la sección 18 de acuerdo a la sugerencia del Comité.

Espero que los cambios permitan a la CINVA la aprobación del protocolo. Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial,

Atentamente,

Dr. Jorge Alcocer Varela





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

aluse

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN

★ 05 FEB 2016 ★
R1676

INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL Y BIOTERIO México, D. F., a 5 de Febrero de 2016.

Dr. José Carlos Alcocer Varela
Depto. Inmunología y Reumatología
Presente.

REF: CINVA-1805 IRE1805-16/20-1

Estimado Dr. Alcocer.:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad””.

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

1. Se sugiere modificar el título para que sea mas específico y deberá incluir los microorganismos que se utilizarán, así como, en la especie que se llevará a cabo el proyecto.
2. En el FAEP se establece una duración de 5 años 11 meses, el máximo permitido para un protocolo según el manual de operaciones de la CINVA es de 3 años con derecho a solicitar una prórroga de 2 años, se sugiere apegarse a esta estructura.
3. El formato Latis está incompleto (falta la pertinencia del grupo de investigadores, instituciones participantes, patrocinio, etc.). Únicamente aparecen dos investigadores, el Dr. Alcocer y el Dr. Crispín, sin embargo, en el formato rápido varios de los procedimientos (la mayoría) se indica que serán realizados por el Dr. Crispín y la QFB. Sánchez Navarro. Se recomienda llenar los apartados correspondientes adecuadamente y definir quienes serán los estudiantes involucrados.
4. Debido a que el protocolo involucra un gran número de ratones, se recomienda coordinar con la jefatura del DIEB, la producción de los animales y la asistencia. Además es importante mencionar que el DIEB no cuenta con mas espacio en equipo adicional al que el investigador tiene para expandir las colonias, por lo que, el investigador tendrá que priorizar los protocolos que tiene autorizados en su grupo.
5. En el punto 14 de la evaluación de signos de deterioro (del FAEP), indican que no se espera que los parámetros cambien durante el estudio pero, en el punto 15 donde se establece el punto final humanitario, se aclara que las infecciones sólo causan malestar general por una semana, lo que podría generar cambios de conducta y algunos signos clínicos y de apariencia. Se recomienda poner algunos ejemplos de estos cambios que determine la detección de alguna anomalía.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN
- 8 FEB 2016
DIRECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN

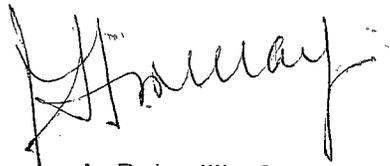
*Recibido
est 8/02/16*

6. Se recomienda describir y enlistar las normas de operación de Listeria y LCMV, en la sección 17 del FAEP.
7. La sección 18 del FAEP, correspondiente al destino final de los animales, se especificó de manera incorrecta, se sugiere lo siguiente para describir éste punto: "Los cadáveres serán colocados dentro de una bolsa de plástico de color rojo resistente a un ciclo de esterilización por vapor (121°C/20lb/in2/30 min), una vez terminado el ciclo la bolsa se colocará dentro de una bolsa de plástico de color amarillo, impermeable con la leyenda "PELIGRO, RESIDUOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS". Se trasladarán al depósito del INCMNSZ.
8. Aclarar si el número de animales propuesto incluye la reproducción y los animales útiles.

Debido a que el sistema Latis dejó de funcionar, le solicitamos que su respuesta al comité y el protocolo modificado sea entregado en forma impresa y el pdf por vía electrónica a los correos: norma.bobadillas@incmnsz.mx y 

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 DIEB

NAB/nom

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 18/12/2015

CLAVE: IRE-1805-16/20-1

TÍTULO: Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad

INVESTIGADOR RESPONSABLE: ALCOCER VARELA JORGE CARLOS

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador Cantidad

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 15/01/2016 al 15/01/2020

Trimestre 1 Trimestre 2 Trimestre 3 Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES			
Personal	\$ 0.00				
(sueldos y sobresueldos al personal)					
Equipos	\$ 0.00				
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)					
Materiales	\$ 0.00	- FIRMAS			
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)					
Animales	\$ 0.00	○		○	
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)					
Estudios	\$ 0.00				
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)					
Viaticos	\$ 0.00			○	
(reuniones científicas y trabajo de campo)					
Publicaciones	\$ 0.00				
costo directos de publicación, sobregiro)					
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 :	\$ 0.00				

Director de Investigación

Director de Asesoría

Fecha de resolución

28-MARZO-2016



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

No. CINVA:
FOLIO DE REGISTRO: IRE-1805-16/20-1

Fecha de registro del Protocolo: 18 de diciembre de 2015

Título del Protocolo: Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad

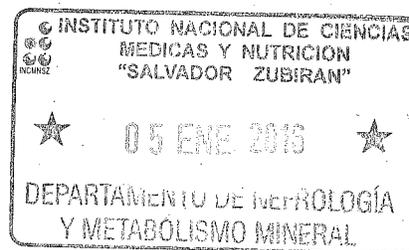
Propuesta: a) Nueva

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Jorge C. Alcocer Varela
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Inmunología y Reumatología
Teléfono	54870900 ext. 2605
Correo electrónico	

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
José Carlos Crispín Acuña	INCMNSZ	Doctorado	54870900 ext. 2610	carlos.cripina@incmnsz.mx

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	INCMNSZ-UNAM	Doctorado	54870900 ext. 2610	

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	Enero 2016		
Fecha tentativa de finalización.	Diciembre 2021		





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:

Objetivo General:

Determinar si existe un defecto en la terminación de la respuesta inmune en pacientes con enfermedades autoinmunes y evaluar la contribución de B55beta al mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la patogenia de enfermedades autoinmunes.

Objetivo Específico:

Estudiar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en un modelo in vivo.

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

Utilizaremos un ratón con deficiencia condicional de *Ppp2r2b*, el gen que codifica B55beta. Dicho animal, generado para desarrollar este proyecto, nos permitirá eliminar el gen *Ppp2r2b* en todas las células hematopoyéticas, en células T, o en células dendríticas (CDs), al hacer cruza con ratones transgénicos que contienen la recombinasa Cre asociada a diferentes promotores. Además, el ratón contiene un reportero de B55beta (LacZ) que nos permitirá analizar la expresión del gen en diferentes momentos y localizaciones de la respuesta inmune. Con esta herramienta única, podremos evaluar el papel de B55beta en respuestas inmunes normales (e.g. infección por *Listeria monocytogenes*) y determinar si su presencia es necesaria para evitar del desarrollo de patología inflamatoria y autoinmune.

1. Analizar las consecuencias de la ausencia de B55beta en células hematopoyéticas. Como estrategia inicial, generaremos una línea de ratones que carezca de B55beta en todas las células hematopoyéticas. Esto se logrará al cruzar el ratón con deficiencia condicional con un ratón que expresa Cre asociado al promotor de *Vav* (Georgiades et al, 2002). Esta estrategia nos permitirá evaluar las funciones del gen en forma global, en todas las células del sistema inmune.

1.1. Determinar si la ausencia de B55beta causa enfermedad autoinmune. Con el fin de determinar si la ausencia de B55beta causa autoinmunidad, vigilaremos a 3 cohortes de ratones de la cepa C57BL/6 durante un año: a) B55beta presente; b) deficiencia heterocigota; c) deficiencia homocigota. Cada mes buscaremos proteinuria, presencia de anticuerpos antinucleares, y mediremos la frecuencia de células T activadas (CD44+ CD62L-) en sangre periférica. Si los ratones no desarrollan enfermedad en forma espontánea, serán sacrificados al año de edad y sus órganos serán analizados en busca de signos de inflamación. Si los ratones se enferman antes, serán sacrificados y analizados en diferentes momentos.

1.2. Estudiar si la ausencia de B55beta altera la contracción de células T. Como experimento inicial, inyectaremos SEB (enterotoxina B de estafilococo) a los ratones. Esto causa la expansión de algunas clonas de células T. Mediremos la frecuencia de las células T CD4 y CD8 que responden a SEB ($V\beta 8$) a lo largo de 2 semanas para observar su expansión y contracción. Compararemos esta cinética en ratones con y sin B55beta. Para el siguiente experimento, cruzaremos a los ratones deficientes en B55beta con ratones OT-I y OT-II (que expresan un receptor de células T específico para péptidos derivados de ovoalbúmina presentados por moléculas de clase I y II, respectivamente). Infectaremos a estos ratones con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbúmina y estudiaremos la expansión y contracción de las clonas de células T CD8 y CD4, respectivamente (Rodríguez-Rodríguez et al, 2015).

2. Analizar los efectos de la deficiencia selectiva de B55beta en células T. Con el fin de diseccionar cuál es la función de B55beta en células T y para identificar las consecuencias de la falla en la terminación de la respuesta inmune en células T, cruzaremos el ratón con deficiencia condicional de B55beta con un ratón que expresa Cre bajo el promotor de CD4 (Lee et al, 2001). Estudiaremos: a) si la activación, proliferación,



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

y diferenciación funcional de las células T es normal; b) si la deficiencia selectiva de B55beta en células T causa enfermedad autoinmune; c) la cinética de expansión y contracción clonal durante infección por *L. monocytogenes*.

3. Evaluar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en CD4 mieloides. En forma análoga a los experimentos del punto 2, cruzaremos el ratón deficiente de B55beta con un ratón CD11c-Cre (Vander Lugt et al., 2014) y evaluaremos el desarrollo de autoinmunidad y la cinética de expansión y contracción clonal durante infección sistémica. Además, evaluaremos si el número y el fenotipo de las CD4 es normal.

4 Analizar la expresión de B55beta durante respuestas inmunes agudas y crónicas. Usaremos el ratón reportero en donde las células que expresan B55beta expresarán LacZ. Infectaremos a los ratones reporteros con dos cepas del virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) que causan una infección aguda (Armstrong) y crónica (clona 13) (Althaus et al., 2007). Durante la infección aguda, analizaremos por citometría de flujo e inmunohistoquímica (REF) la expresión de B55beta (LacZ) en el bazo los días 0 (antes de la infección), 2, 5, 7, 14 y 21. La citometría de flujo permitirá identificar con mayor facilidad qué células expresan B55beta. La inmunohistoquímica revelará en qué estructuras anatómicas (p.ej. centros germinales) se expresa. Durante la infección con la cepa LCMV clona 13 que causa infección crónica, analizaremos la expresión antes de la infección y a las semanas 1, 2, 4, 8, 12 y 24.

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

Categoría C: Los ratones que se usen como donadores de células para experimentos ex vivo, así como los ratones en los que se elimine el gen *Ppp2r2b* de linajes celulares específicos se consideran categoría C porque no se espera que sufran de ninguna molestia.

Categoría D: Los ratones a los que se inyecte SEB o que se infecten con *Listeria* o con LCMV se han catalogado como categoría D porque se espera que tengan síntomas de malestar general durante periodos de un día (en el caso de SEB), de 5 a 7 días (infección con *Listeria* y con la cepa Armstrong de LCMV). La cepa 13 de LCMV causa una infección crónica asintomática en los ratones (<https://www.iacuc.cornell.edu/documents/IACUC009.01.pdf>).

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

Se estima que se necesitaran 1677 ratones en experimentos y 82 ratones como pies de cría (en total 1759 ratones) para realizar el proyecto.

1. Deficiencia de B55beta en células hematopoyéticas

Se analizará el efecto de la deficiencia de B55beta en células hematopoyéticas.

	Cepas de ratones	n por grupo	Eval.	Rep.	n total
Autoinmunidad espontánea	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Vav-Cre	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Vav-Cre	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Vav-Cre	10	1	2	20
Contracción clonal (SEB)	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Vav-Cre	5	4	3	60



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

Contracción clonal de CD4 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Vav-Cre	5	4	3	60
Contracción clonal de CD8 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Vav-Cre	5	4	3	60
Total de ratones					600

2. Deficiencia de B55beta en células T

Se analizará el efecto de la deficiencia de B55beta en linfocitos T.

	Cepas de ratones	n por grupo	Eval.	Rep.	n total
Activación y diferenciación de células <i>in vitro</i>	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd4-Cre	3	1	3	9
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd4-Cre	3	1	3	9
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd4-Cre	3	1	3	9
Autoinmunidad espontánea	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd4-Cre	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd4-Cre	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd4-Cre	10	1	2	20
Contracción clonal de CD4 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd4-Cre	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd4-Cre	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd4-Cre	5	4	3	60
Contracción clonal de CD8 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd4-Cre	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd4-Cre	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd4-Cre	5	4	3	60
Total de ratones					447

3. Deficiencia de B55beta en células dendríticas (CDs) mieloides

Se analizará el efecto de la deficiencia de B55beta en células dendríticas mieloides.

	Cepas de ratones	n por grupo	Eval.	Rep.	n total
Número y fenotipo de CDs	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd11c-Cre	5	1	2	10
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd11c-Cre	5	1	2	10
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd11c-Cre	5	1	2	10



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

Autoinmunidad espontánea	<i>Ppp2r2b^{+/+}.Cd11c-Cre</i>	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b^{fl/+}.Cd11c-Cre</i>	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b^{fl/fl}.Cd11c-Cre</i>	10	1	2	20
Contracción clonal de CD4 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-II. <i>Ppp2r2b^{+/+}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b^{fl/+}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
Contracción clonal de CD8 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-I. <i>Ppp2r2b^{+/+}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b^{fl/+}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
Total de ratones					450

4. Expresión de B55beta durante infecciones agudas y crónicas

Se usará un ratón reportero para analizar la expresión de B55beta durante infecciones virales.

	Cepas de ratones	n por grupo	Eval.	Rep.	n total
Infección aguda (LCMV Armstrong)	<i>Ppp2r2b^{LacZ/+}</i>	5	6	3	90
Infección crónica (LCMV clona 13)	<i>Ppp2r2b^{LacZ/+}</i>	5	6	3	90
Total de ratones					180

Las colonias de ratones (*Ppp2r2b^{fl/fl}*, *Ppp2r2b^{LacZ/+}*, OT-I, OT-II, Cd4-Cre, Vav-Cre y líneas derivadas de éstas) se mantendrán en el bioterio del INCMNSZ en donde tenemos un cuarto asignado con jaulas que han sido adquiridas por la Dra. Rosetti. El personal del bioterio proveerá de apoyo técnico (limpieza y cambio de cama, agua y comida), pero nosotros manejaremos las colonias y realizaremos la genotipificación. Los ratones Cd11c-Cre serán comprados en Jackson Laboratories (Bar Harbor, EUA). Estos cuentan con certificado microbiológico y podrán ser aceptados en el bioterio sin pasar por cuarentena. Las demás cepas las mudaremos del bioterio del Instituto Investigaciones Biomédicas. Previo a su traslado se solicitará permiso a la M.V.Z Mariela Contreras Escamilla, a quien se entregará un certificado de salud. Estos ratones se someterán a cuarentena.

- 6) Describir como se realizará 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. Para su sacrificio, los ratones se movilizarán al laboratorio del Dr. Crispín, ubicado dentro del Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ. Para esto, se llevarán cargados en las cajas correspondientes directamente del bioterio al laboratorio.



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

- 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 fondo genético C57BL/6 (B6).

OT-I: Son ratones transgénicos que cuentan con las cadenas transgénicas α y β de un TCR que reconoce un péptido derivado de ovalbúmina (OVA) presentado por moléculas de clase I.

OT-II: Son ratones transgénicos que cuentan con las cadenas transgénicas α y β de un TCR que reconoce un péptido derivado de ovalbúmina (OVA) presentado por moléculas de clase II.

Ppp2r2b^{fl/m}: Tienen el 3er exón del gen que codifica para B55beta (*Ppp2r2b*) flanqueado por regiones *Lox* que son reconocidas por la recombinasa de DNA Cre. Eso permite eliminar dicho exón en células que expresan Cre. Al cruzar esta línea con ratones que expresan Cre bajo el control de diferentes promotores, se producen líneas con deficiencia condicional de B55beta.

Ppp2r2b^{LacZ/+}: Este ratón tiene un alelo de *Ppp2r2b* en donde se ha insertado el gen *LacZ* (que codifica para la β galactosidasa). El resultado es que se expresa β galactosidasa en las células que deberían expresar B55beta. Los ratones heterocigotos (i.e. con un alelo nativo de *Ppp2r2b*) expresan B55beta y β galactosidasa. Esta última puede ser reconocida con anticuerpos específicos para citometría de flujo y en inmunohistoquímica.

Cd4-Cre: Este ratón tiene un transgén que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor de *Cd4*.

Cd11c-Cre: Este ratón tiene un transgén que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor de *Cd11c*.

Vav-Cre: Este ratón tiene un transgén que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor de *Vav*.

Programa de Producción de cepas y Reproducción (planeado para 2 años):

1. *Ppp2r2b^{fl/m} Vav-Cre*

Se cruzarán ratones *Ppp2r2b^{fl/m}* y *Vav-Cre* para obtener esta línea. La primera generación será *Ppp2r2b^{fl/+}* con o sin el transgén *Vav-Cre*. Se escogerán *Ppp2r2b^{fl/+} Vav-Cre⁺* como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras *Vav-Cre⁺* homocigotas para el alelo silvestre de *Ppp2r2b* (*Ppp2r2b^{+/+}*) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl (*Ppp2r2b^{fl/m}* y *Ppp2r2b^{fl/+}*, respectivamente).

Ratones necesarios: 80 de cada genotipo (80 ^{fl/m}, 80 ^{fl/+} y 80 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea *Ppp2r2b^{+/+}*, 25% *Ppp2r2b^{+/+}* y 50% *Ppp2r2b^{fl/+}*. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 8 hembras como pie de cría.

2. *OT-II.Ppp2r2b^{fl/m} Vav-Cre*

Inicialmente, se cruzarán ratones OT-II y *Ppp2r2b^{fl/m}* para obtener ratones OT-II.*Ppp2r2b^{fl/+}*. La primera generación será *Ppp2r2b^{fl/+}* con o sin el transgén OT-II. Se cruzarán *Ppp2r2b^{fl/+} OT-II⁺* con ratones *Vav-Cre* y se escogerán crías *Ppp2r2b^{fl/+} OT-II⁺ Vav-Cre⁺* como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-II⁺ *Vav-Cre⁺* homocigotas para el alelo silvestre de *Ppp2r2b* (*Ppp2r2b^{+/+}*) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl (*Ppp2r2b^{fl/m}* y *Ppp2r2b^{fl/+}*, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/m}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea *Ppp2r2b^{+/+}*, 25% *Ppp2r2b^{+/+}* y 50% *Ppp2r2b^{fl/+}*. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requerirán 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

3. *OT-I.Ppp2r2b^{fl/m} Vav-Cre*

Inicialmente, se cruzarán ratones OT-I y *Ppp2r2b^{fl/m}* para obtener ratones OT-I.*Ppp2r2b^{fl/+}*. La primera



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

generación será $Ppp2r2b^{fl/+}$ con o sin el transgén OT-I. Se cruzarán $Ppp2r2b^{fl/+}$.OT-I⁺ con ratones Vav-Cre y se escogerán crías $Ppp2r2b^{fl/+}$ OT-I⁺ Vav-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-I⁺ Vav-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/fl}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requirerán 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

4. $Ppp2r2b^{fl/fl}$.Cd4-Cre

Se cruzarán ratones $Ppp2r2b^{fl/fl}$ y Cd4-Cre para obtener esta línea. La primera generación será $Ppp2r2b^{fl/+}$ con o sin el transgén Cd4-Cre. Se escogerán $Ppp2r2b^{fl/+}$.Cd4-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras Cd4-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 29 de cada genotipo (29 ^{fl/fl}, 29 ^{fl/+} y 29 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

5. OT-II. $Ppp2r2b^{fl/fl}$.Cd4-Cre

Se cruzarán ratones $Ppp2r2b^{fl/+}$.OT-II⁺ con ratones Cd4-Cre y se escogerán crías $Ppp2r2b^{fl/+}$ OT-II⁺ Cd4-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-II⁺ Cd4-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/fl}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

6. OT-I. $Ppp2r2b^{fl/fl}$.Cd4-Cre

Inicialmente, se cruzarán ratones OT-I y $Ppp2r2b^{fl/fl}$ para obtener ratones OT-I. $Ppp2r2b^{fl/+}$. La primera generación será $Ppp2r2b^{fl/+}$ con o sin el transgén OT-I. Se cruzarán $Ppp2r2b^{fl/+}$.OT-I⁺ con ratones Cd4-Cre y se escogerán crías $Ppp2r2b^{fl/+}$ OT-I⁺ Cd4-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-I⁺ Cd4-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/fl}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

7. $Ppp2r2b^{fl/fl}$.Cd11c-Cre

Se cruzarán ratones $Ppp2r2b^{fl/fl}$ y Cd11c-Cre para obtener esta línea. La primera generación será $Ppp2r2b^{fl/+}$ con o sin el transgén Cd11c-Cre. Se escogerán $Ppp2r2b^{fl/+}$.Cd11c-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras Cd11c-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 30 de cada genotipo (30 ^{fl/fl}, 30 ^{fl/+} y 30 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 1 macho y 3 hembras como pie de cría.



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

8. OT-II. *Ppp2r2b^{fl/fl}*. Cd11c-Cre
 Se cruzarán ratones *Ppp2r2b^{fl/fl}*. OT-II⁺ con ratones Cd11c-Cre y se escogerán crías *Ppp2r2b^{fl/+}* OT-II⁺ Cd11c-Cre⁺ como pies de cría.
 Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-II⁺ Cd11c-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de *Ppp2r2b* (*Ppp2r2b^{+/+}*) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl (*Ppp2r2b^{fl/fl}* y *Ppp2r2b^{fl/+}*, respectivamente).
 Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/fl}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).
 Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.
 De éstos, se espera que el 25% sea *Ppp2r2b^{-/-}*, 25% *Ppp2r2b^{+/+}* y 50% *Ppp2r2b^{fl/+}*. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

9. OT-I. *Ppp2r2b^{fl/fl}*. Cd11c-Cre
 Inicialmente, se cruzarán ratones OT-I y *Ppp2r2b^{fl/fl}* para obtener ratones OT-I. *Ppp2r2b^{fl/+}*. La primera generación será *Ppp2r2b^{fl/+}* con o sin el transgén OT-I. Se cruzarán *Ppp2r2b^{fl/+}*. OT-I⁺ con ratones Cd11c-Cre y se escogerán crías *Ppp2r2b^{fl/+}* OT-I⁺ Cd11c-Cre⁺ como pies de cría.
 Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-I⁺ Cd11c-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de *Ppp2r2b* (*Ppp2r2b^{+/+}*) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl (*Ppp2r2b^{fl/fl}* y *Ppp2r2b^{fl/+}*, respectivamente).
 Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/fl}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).
 Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.
 De éstos, se espera que el 25% sea *Ppp2r2b^{-/-}*, 25% *Ppp2r2b^{+/+}* y 50% *Ppp2r2b^{fl/+}*. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

10. *Ppp2r2b^{LacZ/+}*
 Se mantendrá la línea cruzando ratones heterocigotos (*Ppp2r2b^{LacZ/+}*).
 Se usarán en experimentos ratonas hembras heterocigotas (*Ppp2r2b^{LacZ/+}*).
 Ratones necesarios: 180.
 Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.
 De éstos, se espera que el 50% sea *Ppp2r2b^{LacZ/+}*. Esto es 20 crías por pareja/año. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (10 por pareja/año), se requieren 3 machos y 9 hembras como pie de cría.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
<i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Vav-Cre	240	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-II. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Vav-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-I. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Vav-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
<i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Cd4-Cre	87	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-II. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Cd4-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-I. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Cd4-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
<i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Cd11c-Cre	90	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-II. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Cd11c-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-I. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Cd11c-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
<i>Ppp2r2b^{LacZ/+}</i>	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
<i>Ppp2r2b^{fl/fl}</i> . Vav-Cre, Cd4-Cre, Cd11c-Cre, OT-I, OT-II, <i>Ppp2r2b^{LacZ/+}</i> (pies de cría)	82	20-25g	8-12 sem	Hembras y Machos
No. TOTAL DE ANIMALES: 1759				

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.
 Se mantendrán las colonias en el bioterio durante la duración del proyecto.
 La duración de los experimentos es variable, algunos están planeados para durar 2 semanas y algunos hasta un año (la observación de cada cohorte con deficiencia condicional de B55beta).



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

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	Biopsia de cola para genotipificación. En una ocasión (a las 2-3 semanas de edad). Toma de muestra de orina (mensual). Toma de muestra de sangre (50 µL) una vez al mes.
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	Infección con <i>Listeria monocytogenes</i> y con LCMV. Inyección de SEB.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
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: Colocación de arete numerado		X	En una ocasión, al momento de la biopsia de cola.

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 y colocación de arete numerado

Se cortará una porción de la cola de los ratones (0.1-0.2 cm) entre las 2 y las 3 semanas de edad, como fuente de DNA. Se colocará un arete numerado en la oreja izquierda para la identificación del ratón. Este procedimiento será realizado por José C. Crispín o Gabriela Sánchez Navarro.

Toma de muestra de orina

Se sujeta al ratón y se le coloca un tubo eppendorf de 1.8 mL para recibir la orina. Sólo se requiere de 10 µL de orina.

Toma de muestra de sangre

Se coloca al ratón en un inmovilizador con la cola expuesta. Se limpia la cola con una torunda con alcohol y se realiza una incisión a 45° de un mm de profundidad a nivel de la vena caudal. Se colecta la sangre en un tubo capilar. Al terminar, se presiona el sitio de la herida hasta que pare el sangrado.

Aislamiento de Células T y presentadoras de antígenos

Los ratones serán sacrificados bajo la norma institucional y se diseccionarán los tejidos necesarios. Para obtener células T, se usarán ganglios linfáticos (axilares e inguinales) y bazo. Para obtener células dendríticas, se aislará médula ósea del fémur.

Inyección de SEB

Se colocará al ratón receptor en un inmovilizador con la cola expuesta. Se localizará la vena caudal y se



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

inyectará la enterotoxina B de estafilococo (10 µg en 50 µL de PBS). Se liberará al ratón y se devolverá a su jaula.

Infección con *Listeria monocytogenes*

Se colocará al ratón receptor en un inmovilizador con la cola expuesta. Se localizará la vena caudal y se inyectará la *Listeria monocytogenes* (3000 cfu en 100 µL de PBS). Se liberará al ratón y se devolverá a su jaula. Los ratones de la jaula, así como la jaula y el material de cama se esterilizan antes de ser desechados o vueltos a usar.

Infección con LCMV (*virus de coriomeningitis linfocítica*)

Se sujeta al ratón exponiendo su abdomen y se le inyecta por vía intraperitoneal 2×10^5 pfu de LCMV Armstrong en 200 µL de RPMI o 2×10^6 pfu de LCMV Clona 13 in 200µL de RPMI. Se libera al ratón y se devuelve a su jaula. Los ratones de la jaula, así como la jaula y el material de cama se esterilizan antes de ser desechados o vueltos a usar.

Se anexan las normas de operación de Listeria y LCMV

José C. Crispín y Gabriela Sánchez Navarro realizarán estos procedimientos.

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

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
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.

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

No se espera que estos parámetros cambien durante el 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			



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

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

Las infecciones que se inducirán solamente causan malestar general en los ratones de aproximadamente una semana de duración. No se espera que los ratones que se observarán desarrollen enfermedad espontánea. Sin embargo, los animales se observarán y se registrarán cambios en su comportamiento y apariencia. Si detectamos enfermedad en los ratones, manifestada por pérdida de peso moderada a grave (10-20%) o cambios en su comportamiento, se sacrificará al ratón. En otras palabras, 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

En base en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en qué 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. Substantial > 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

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

Asfixia con CO₂

17) ¿El protocolo representa riesgo biológico?

Si.

Se anexan las normas de operación de Listeria y LCMV en donde se describen los procedimientos y precauciones necesarias para evitar el riesgo biológico.

Los experimentos en los que se infecten ratones con Listeria o con LCMV se realizarán en el cuarto de BSL3 del bioterio a cargo del Dr. Rogelio Hernández Pando. Hemos hablado con él y nos ha dado su autorización para eso.

Los ratones infectados serán sacrificados en el bioterio, antes de salir del área BSL3. Los cadáveres, así como el material (jaulas y contenido) serán esterilizados por autoclave antes de salir del área BSL3.



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

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.

Jorge Alcocer Varela

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	



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

No. CINVA:
FOLIO DE REGISTRO: IRE-1805-16/20-1

Fecha de registro del Protocolo: 18 de diciembre de 2015

Título del Protocolo: Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad

Propuesta: a) Nueva

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Jorge C. Alcocer Varela
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Inmunología y Reumatología
Teléfono	54870900 ext. 2605
Correo electrónico	Ø

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
José Carlos Crispín Acuña	INCMNSZ	Doctorado	54870900 ext. 2610	carlos.cripina@incmnsz.mx

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
Ø	INCMNSZ-UNAM	Doctorado	54870900 ext. 2610	Ø

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	1 de marzo de 2016		
Fecha tentativa de finalización:	28 de febrero de 2019		



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:

Objetivo General:

Determinar si existe un defecto en la terminación de la respuesta inmune en pacientes con enfermedades autoinmunes y evaluar la contribución de B55beta al mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la patogenia de enfermedades autoinmunes.

Objetivo Específico:

Estudiar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en un modelo in vivo.

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

Utilizaremos un ratón con deficiencia condicional de *Ppp2r2b*, el gen que codifica B55beta. Dicho animal, generado para desarrollar este proyecto, nos permitirá eliminar el gen *Ppp2r2b* en todas las células hematopoyéticas, en células T, o en células dendríticas (CDs), al hacer cruces con ratones transgénicos que contienen la recombinasa Cre asociada a diferentes promotores. Además, el ratón contiene un reportero de B55beta (LacZ) que nos permitirá analizar la expresión del gen en diferentes momentos y localizaciones de la respuesta inmune. Con esta herramienta única, podremos evaluar el papel de B55beta en respuestas inmunes normales (e.g. infección por *Listeria monocytogenes*) y determinar si su presencia es necesaria para evitar del desarrollo de patología inflamatoria y autoinmune.

1. Analizar las consecuencias de la ausencia de B55beta en células hematopoyéticas. Como estrategia inicial, generaremos una línea de ratones que carezca de B55beta en todas las células hematopoyéticas. Esto se logrará al cruzar el ratón con deficiencia condicional con un ratón que expresa Cre asociado al promotor de *Vav* (Georgiades et al, 2002). Esta estrategia nos permitirá evaluar las funciones del gen en forma global, en todas las células del sistema inmune.

1.1. Determinar si la ausencia de B55beta causa enfermedad autoinmune. Con el fin de determinar si la ausencia de B55beta causa autoinmunidad, vigilarémos a 3 cohortes de ratones de la cepa C57BL/6 durante un año: a) B55beta presente; b) deficiencia heterocigota; c) deficiencia homocigota. Cada mes buscaremos proteinuria, presencia de anticuerpos antinucleares, y mediremos la frecuencia de células T activadas (CD4+ CD62L-) en sangre periférica. Si los ratones no desarrollan enfermedad en forma espontánea, serán sacrificados al año de edad y sus órganos serán analizados en busca de signos de inflamación. Si los ratones se enferman antes, serán sacrificados y analizados en diferentes momentos.

1.2. Estudiar si la ausencia de B55beta altera la contracción de células T. Como experimento inicial, inyectaremos SEB (enterotoxina B de estafilococo) a los ratones. Esto causa la expansión de algunas clonas de células T. Mediremos la frecuencia de las células T CD4 y CD8 que responden a SEB (Vbeta8) a lo largo de 2 semanas para observar su expansión y contracción. Compararemos esta cinética en ratones con y sin B55beta. Para el siguiente experimento, cruzaremos a los ratones deficientes en B55beta con ratones OT-I y OT-II (que expresan un receptor de células T específico para péptidos derivados de ovoalbúmina presentados por moléculas de clase I y II, respectivamente). Infectaremos a estos ratones con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbúmina y estudiaremos la expansión y contracción de las clonas de células T CD8 y CD4, respectivamente (Rodríguez-Rodríguez et al, 2015).

2. Analizar los efectos de la deficiencia selectiva de B55beta en células T. Con el fin de diseccionar cuál es la función de B55beta en células T y para identificar las consecuencias de la falla en la terminación de la respuesta inmune en células T, cruzaremos el ratón con deficiencia condicional de B55beta con un ratón que expresa Cre bajo el promotor de CD4 (Lee et al, 2001). Estudiaremos: a) si la activación, proliferación,



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

y diferenciación funcional de las células T es normal; b) si la deficiencia selectiva de B55beta en células T causa enfermedad autoinmune; c) la cinética de expansión y contracción clonal durante infección por *L. monocytogenes*.

3. Evaluar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en CD4 mieloides. En forma análoga a los experimentos del punto 2, cruzaremos el ratón deficiente de B55beta con un ratón CD11c-Cre (Vander Lugt et al., 2014) y evaluaremos el desarrollo de autoinmunidad y la cinética de expansión y contracción clonal durante infección sistémica. Además, evaluaremos si el número y el fenotipo de las CD4 es normal.

4 Analizar la expresión de B55beta durante respuestas inmunes agudas y crónicas. Usaremos el ratón reportero en donde las células que expresan B55beta expresarán LacZ. Infectaremos a los ratones reporteros con dos cepas del virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) que causan una infección aguda (Armstrong) y crónica (clona 13) (Althaus et al., 2007). Durante la infección aguda, analizaremos por citometría de flujo e inmunohistoquímica (REF) la expresión de B55beta (LacZ) en el bazo los días 0 (antes de la infección), 2, 5, 7, 14 y 21. La citometría de flujo permitirá identificar con mayor facilidad qué células expresan B55beta. La inmunohistoquímica revelará en qué estructuras anatómicas (e.g. centros germinales) se expresa. Durante la infección con la cepa LCMV clona 13 que causa infección crónica, analizaremos la expresión antes de la infección y a las semanas 1, 2, 4, 8, 12 y 24.

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

Categoría C: Los ratones que se usen como donadores de células para experimentos ex vivo, así como los ratones en los que se elimine el gen *Ppp2r2b* de linajes celulares específicos se consideran categoría C porque no se espera que sufran de ninguna molestia.

Categoría D: Los ratones a los que se inyecte SEB o que se infecten con *Listeria* o con LCMV se han catalogado como categoría D porque se espera que tengan síntomas de malestar general durante periodos de un día (en el caso de SEB), de 5 a 7 días (infección con *Listeria* y con la cepa Armstrong de LCMV). La cepa 13 de LCMV causa una infección crónica asintomática en los ratones (<https://www.iacuc.cornell.edu/documents/IACUC009.01.pdf>).

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

Se estima que se necesitaran 1677 ratones en experimentos y 82 ratones como pies de cría (en total 1759 ratones) para realizar el proyecto.

1. Deficiencia de B55beta en células hematopoyéticas

Se analizará el efecto de la deficiencia de B55beta en células hematopoyéticas.

	Cepas de ratones	n por grupo	Eval.	Rep.	n total
Autoinmunidad espontánea	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Vav-Cre	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Vav-Cre	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Vav-Cre	10	1	2	20
Contracción clonal (SEB)	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Vav-Cre	5	4	3	60



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

Contracción clonal de CD4 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Vav-Cre	5	4	3	60
Contracción clonal de CD8 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Vav-Cre	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Vav-Cre	5	4	3	60
Total de ratones					600

2. Deficiencia de B55beta en células T

Se analizará el efecto de la deficiencia de B55beta en linfocitos T.

	Cepas de ratones	n por grupo	Eval.	Rep.	n total
Activación y diferenciación de células <i>in vitro</i>	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd4-Cre	3	1	3	9
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd4-Cre	3	1	3	9
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd4-Cre	3	1	3	9
Autoinmunidad espontánea	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd4-Cre	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd4-Cre	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd4-Cre	10	1	2	20
Contracción clonal de CD4 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd4-Cre	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd4-Cre	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd4-Cre	5	4	3	60
Contracción clonal de CD8 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd4-Cre	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd4-Cre	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd4-Cre	5	4	3	60
Total de ratones					447

3. Deficiencia de B55beta en células dendríticas (CDs) mieloides

Se analizará el efecto de la deficiencia de B55beta en células dendríticas mieloides.

	Cepas de ratones	n por grupo	Eval.	Rep.	n total
Número y fenotipo de CDs	<i>Ppp2r2b</i> ^{+/+} .Cd11c-Cre	5	1	2	10
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/+} .Cd11c-Cre	5	1	2	10
	<i>Ppp2r2b</i> ^{fl/fl} .Cd11c-Cre	5	1	2	10



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

Autoinmunidad espontánea	<i>Ppp2r2b^{+/+}.Cd11c-Cre</i>	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b^{fl/+}.Cd11c-Cre</i>	10	1	2	20
	<i>Ppp2r2b^{fl/fl}.Cd11c-Cre</i>	10	1	2	20
Contracción clonal de CD4 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-II. <i>Ppp2r2b^{+/+}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b^{fl/+}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
	OT-II. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
Contracción clonal de CD8 durante infección aguda con <i>L. monocytogenes</i>	OT-I. <i>Ppp2r2b^{+/+}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b^{fl/+}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
	OT-I. <i>Ppp2r2b^{fl/fl}.Cd11c-Cre</i>	5	4	3	60
Total de ratones					450

4. Expresión de B55beta durante infecciones agudas y crónicas

Se usará un ratón reportero para analizar la expresión de B55beta durante infecciones virales.

	Cepas de ratones	n por grupo	Eval.	Rep.	n total
Infección aguda (LCMV Armstrong)	<i>Ppp2r2b^{LacZ/+}</i>	5	6	3	90
Infección crónica (LCMV clona 13)	<i>Ppp2r2b^{LacZ/+}</i>	5	6	3	90
Total de ratones					180

Las colonias de ratones (*Ppp2r2b^{fl/fl}*, *Ppp2r2b^{LacZ/+}*, OT-I, OT-II, Cd4-Cre, Vav-Cre y líneas derivadas de éstas) se mantendrán en el bioterio del INCMNSZ en donde tenemos un cuarto asignado con jaulas que han sido adquiridas por la Dra. Rosetti. El personal del bioterio proveerá de apoyo técnico (limpieza y cambio de cama, agua y comida), pero nosotros manejaremos las colonias y realizaremos la genotipificación. Los ratones Cd11c-Cre serán comprados en Jackson Laboratories (Bar Harbor, EUA). Éstos cuentan con certificado microbiológico y podrán ser aceptados en el bioterio sin pasar por cuarentena. Las demás cepas las mudaremos del bioterio del Instituto Investigaciones Biomédicas. Previo a su traslado se solicitará permiso a la M.V.Z Mariela Contreras Escamilla, a quien se entregará un certificado de salud. Estos ratones se someterán a cuarentena.

- 6) Describir cómo se realizará 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. Para su sacrificio, los ratones se movilizarán al laboratorio del Dr. Crispín, ubicado dentro del Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ. Para esto, se llevarán cargados en las cajas correspondientes directamente del bioterio al laboratorio.



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

- 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 fondo genético C57BL/6 (B6).

OT-I: Son ratones transgénicos que cuentan con las cadenas transgénicas α y β de un TCR que reconoce un péptido derivado de ovalbúmina (OVA) presentado por moléculas de clase I.

OT-II: Son ratones transgénicos que cuentan con las cadenas transgénicas α y β de un TCR que reconoce un péptido derivado de ovalbúmina (OVA) presentado por moléculas de clase II.

***Ppp2r2b^{fl/fl}*:** Tienen el 3er exón del gen que codifica para B55beta (*Ppp2r2b*) flanqueado por regiones *Lox* que son reconocidas por la recombinasa de DNA Cre. Eso permite eliminar dicho exón en células que expresan Cre. Al cruzar esta línea con ratones que expresan Cre bajo el control de diferentes promotores, se producen líneas con deficiencia condicional de B55beta.

***Ppp2r2b^{LacZ+}*:** Este ratón tiene un alelo de *Ppp2r2b* en donde se ha insertado el gen *LacZ* (que codifica para la β galactosidasa). El resultado es que se expresa β galactosidasa en las células que deberían expresar B55beta. Los ratones heterocigotos (i.e. con un alelo nativo de *Ppp2r2b*) expresan B55beta y β galactosidasa. Esta última puede ser reconocida con anticuerpos específicos para citometría de flujo y en inmunohistoquímica.

***Cd4-Cre*:** Este ratón tiene un transgén que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor de *Cd4*.

***Cd11c-Cre*:** Este ratón tiene un transgén que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor de *Cd11c*.

***Vav-Cre*:** Este ratón tiene un transgén que codifica para la recombinasa Cre bajo el control del promotor de *Vav*.

Programa de Producción de cepas y Reproducción (planeado para 2 años):

1. *Ppp2r2b^{fl/fl}.Vav-Cre*

Se cruzarán ratones *Ppp2r2b^{fl/fl}* y *Vav-Cre* para obtener esta línea. La primera generación será *Ppp2r2b^{fl/+}* con o sin el transgén *Vav-Cre*. Se escogerán *Ppp2r2b^{fl/+}.Vav-Cre⁺* como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras *Vav-Cre⁺* homocigotas para el alelo silvestre de *Ppp2r2b* (*Ppp2r2b^{+/+}*) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl (*Ppp2r2b^{fl/fl}* y *Ppp2r2b^{fl/+}*, respectivamente).

Ratones necesarios: 80 de cada genotipo (80 ^{fl/fl}, 80 ^{fl/+} y 80 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea *Ppp2r2b^{+/+}*, 25% *Ppp2r2b^{+/+}* y 50% *Ppp2r2b^{fl/+}*. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 8 hembras como pie de cría.

2. *OT-II.Ppp2r2b^{fl/fl}.Vav-Cre*

Inicialmente, se cruzarán ratones OT-II y *Ppp2r2b^{fl/fl}* para obtener ratones OT-II.*Ppp2r2b^{fl/+}*. La primera generación será *Ppp2r2b^{fl/+}* con o sin el transgén OT-II. Se cruzarán *Ppp2r2b^{fl/+}.OT-II⁺* con ratones *Vav-Cre* y se escogerán crías *Ppp2r2b^{fl/+}.OT-II⁺.Vav-Cre⁺* como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-II⁺ *Vav-Cre⁺* homocigotas para el alelo silvestre de *Ppp2r2b* (*Ppp2r2b^{+/+}*) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl (*Ppp2r2b^{fl/fl}* y *Ppp2r2b^{fl/+}*, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/fl}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea *Ppp2r2b^{+/+}*, 25% *Ppp2r2b^{+/+}* y 50% *Ppp2r2b^{fl/+}*. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

3. *OT-I.Ppp2r2b^{fl/fl}.Vav-Cre*

Inicialmente, se cruzarán ratones OT-I y *Ppp2r2b^{fl/fl}* para obtener ratones OT-I.*Ppp2r2b^{fl/+}*. La primera



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

generación será $Ppp2r2b^{fl/+}$ con o sin el transgén OT-I. Se cruzarán $Ppp2r2b^{fl/+}$.OT-I⁺ con ratones Vav-Cre y se escogerán crías $Ppp2r2b^{fl/+}$ OT-I⁺ Vav-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-I⁺ Vav-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 $^{fl/fl}$, 60 $^{fl/+}$ y 60 $^{+/+}$).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

4. $Ppp2r2b^{fl/fl}$.Cd4-Cre

Se cruzarán ratones $Ppp2r2b^{fl/fl}$ y Cd4-Cre para obtener esta línea. La primera generación será $Ppp2r2b^{fl/+}$ con o sin el transgén Cd4-Cre. Se escogerán $Ppp2r2b^{fl/+}$.Cd4-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras Cd4-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 29 de cada genotipo (29 $^{fl/fl}$, 29 $^{fl/+}$ y 29 $^{+/+}$).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

5. OT-II. $Ppp2r2b^{fl/fl}$.Cd4-Cre

Se cruzarán ratones $Ppp2r2b^{fl/+}$.OT-II⁺ con ratones Cd4-Cre y se escogerán crías $Ppp2r2b^{fl/+}$ OT-II⁺ Cd4-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-II⁺ Cd4-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 $^{fl/fl}$, 60 $^{fl/+}$ y 60 $^{+/+}$).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

6. OT-I. $Ppp2r2b^{fl/fl}$.Cd4-Cre

Inicialmente, se cruzarán ratones OT-I y $Ppp2r2b^{fl/fl}$ para obtener ratones OT-I. $Ppp2r2b^{fl/+}$. La primera generación será $Ppp2r2b^{fl/+}$ con o sin el transgén OT-I. Se cruzarán $Ppp2r2b^{fl/+}$.OT-I⁺ con ratones Cd4-Cre y se escogerán crías $Ppp2r2b^{fl/+}$ OT-I⁺ Cd4-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-I⁺ Cd4-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 $^{fl/fl}$, 60 $^{fl/+}$ y 60 $^{+/+}$).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

7. $Ppp2r2b^{fl/fl}$.Cd11c-Cre

Se cruzarán ratones $Ppp2r2b^{fl/fl}$ y Cd11c-Cre para obtener esta línea. La primera generación será $Ppp2r2b^{fl/+}$ con o sin el transgén Cd11c-Cre. Se escogerán $Ppp2r2b^{fl/+}$.Cd11c-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras Cd11c-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de $Ppp2r2b$ ($Ppp2r2b^{+/+}$) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl ($Ppp2r2b^{fl/fl}$ y $Ppp2r2b^{fl/+}$, respectivamente).

Ratones necesarios: 30 de cada genotipo (30 $^{fl/fl}$, 30 $^{fl/+}$ y 30 $^{+/+}$).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea $Ppp2r2b^{-/-}$, 25% $Ppp2r2b^{+/+}$ y 50% $Ppp2r2b^{fl/+}$. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 1 macho y 3 hembras como pie de cría.



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

8. OT-II.Ppp2r2b^{fl/m}.Cd11c-Cre

Se cruzarán ratones Ppp2r2b^{fl/+}.OT-II⁺ con ratones Cd11c-Cre y se escogerán crías Ppp2r2b^{fl/+} OT-II⁺ Cd11c-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-II⁺ Cd11c-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de Ppp2r2b (Ppp2r2b^{+/+}) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl (Ppp2r2b^{fl/m} y Ppp2r2b^{fl/+}, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/m}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea Ppp2r2b^{+/+}, 25% Ppp2r2b^{fl/+} y 50% Ppp2r2b ^{fl/+}. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

9. OT-I.Ppp2r2b^{fl/m}.Cd11c-Cre

Inicialmente, se cruzarán ratones OT-I y Ppp2r2b^{fl/m} para obtener ratones OT-I.Ppp2r2b^{fl/+}. La primera generación será Ppp2r2b^{fl/+} con o sin el transgén OT-I. Se cruzarán Ppp2r2b^{fl/+}.OT-I⁺ con ratones Cd11c-Cre y se escogerán crías Ppp2r2b^{fl/+} OT-I⁺ Cd11c-Cre⁺ como pies de cría.

Se usarán en experimentos las ratonas hembras OT-I⁺ Cd11c-Cre⁺ homocigotas para el alelo silvestre de Ppp2r2b (Ppp2r2b^{+/+}) y homocigotas y heterocigotas para el alelo fl (Ppp2r2b^{fl/m} y Ppp2r2b^{fl/+}, respectivamente).

Ratones necesarios: 60 de cada genotipo (60 ^{fl/m}, 60 ^{fl/+} y 60 ^{+/+}).

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 25% sea Ppp2r2b^{+/+}, 25% Ppp2r2b^{fl/+} y 50% Ppp2r2b ^{fl/+}. Esto es 10, 10 y 20 crías por pareja/año, respectivamente. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (5, 5 y 10 por pareja/año), se requieren 2 machos y 6 hembras como pie de cría.

10. Ppp2r2b^{LacZ/+}

Se mantendrá la línea cruzando ratones heterocigotos (Ppp2r2b^{LacZ/+}).

Se usarán en experimentos ratonas hembras heterocigotas (Ppp2r2b^{LacZ/+}).

Ratones necesarios: 180.

Asumiendo 5 crías por embarazo, 8 embarazos al año, se esperan 40 crías por pareja/año.

De éstos, se espera que el 50% sea Ppp2r2b^{LacZ/+}. Esto es 20 crías por pareja/año. Dado que se usarán sólo hembras para los experimentos (10 por pareja/año), se requieren 3 machos y 9 hembras como pie de cría.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ppp2r2b ^{fl/m} .Vav-Cre	240	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-II.Ppp2r2b ^{fl/m} .Vav-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-I.Ppp2r2b ^{fl/m} .Vav-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
Ppp2r2b ^{fl/m} .Cd4-Cre	87	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-II.Ppp2r2b ^{fl/m} .Cd4-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-I.Ppp2r2b ^{fl/m} .Cd4-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
Ppp2r2b ^{fl/m} .Cd11c-Cre	90	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-II.Ppp2r2b ^{fl/m} .Cd11c-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
OT-I.Ppp2r2b ^{fl/m} .Cd11c-Cre	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
Ppp2r2b ^{LacZ/+}	180	20-25g	8-12 sem	Hembras
Ppp2r2b ^{fl/m} , Vav-Cre, Cd4-Cre, Cd11c-Cre, OT-I, OT-II, Ppp2r2b ^{LacZ/+} (pies de cría)	82	20-25g	8-12 sem	Hembras y Machos
No. TOTAL DE ANIMALES:	1759			

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.

Se mantendrán las colonias en el bioterio durante la duración del proyecto.

La duración de los experimentos es variable, algunos están planeados para durar 2 semanas y algunos hasta un año (la observación de cada cohorte con deficiencia condicional de B55beta).



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

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	Biopsia de cola para genotipificación. En una ocasión (a las 2-3 semanas de edad). Toma de muestra de orina (mensual). Toma de muestra de sangre (50 µL) una vez al mes.
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos:		X	Infección con <i>Listeria monocytogenes</i> y con LCMV. Inyección de SEB.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
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: Colocación de arete numerado		X	En una ocasión, al momento de la biopsia de cola.

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 y colocación de arete numerado
 Se cortará una porción de la cola de los ratones (0.1-0.2 cm) entre las 2 y las 3 semanas de edad, como fuente de DNA. Se colocará un arete numerado en la oreja izquierda para la identificación del ratón. Este procedimiento será realizado por José C. Crispín o Gabriela Sánchez Navarro.

Toma de muestra de orina
 Se sujeta al ratón y se le coloca un tubo eppendorf de 1.8 mL para recibir la orina. Sólo se requiere de 10 µL de orina.

Toma de muestra de sangre
 Se coloca al ratón en un inmovilizador con la cola expuesta. Se limpia la cola con una torunda con alcohol y se realiza una incisión a 45° de un mm de profundidad a nivel de la vena caudal. Se colecta la sangre en un tubo capilar. Al terminar, se presiona el sitio de la herida hasta que pare el sangrado.

Aislamiento de Células T y presentadoras de antígenos
 Los ratones serán sacrificados bajo la norma institucional y se diseccionarán los tejidos necesarios. Para obtener células T, se usarán ganglios linfáticos (axilares e inguinales) y bazo. Para obtener células dendríticas, se aislará médula ósea del fémur.

Inyección de SEB
 Se colocará al ratón receptor en un inmovilizador con la cola expuesta. Se localizará la vena caudal y se



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

inyectará la enterotoxina B de estafilococo (10 µg en 50 µL de PBS). Se liberará al ratón y se devolverá a su jaula.

Infección con *Listeria monocytogenes*

Se colocará al ratón receptor en un inmovilizador con la cola expuesta. Se localizará la vena caudal y se inyectará la *Listeria monocytogenes* (3000 cfu en 100 µL de PBS). Se liberará al ratón y se devolverá a su jaula. Los ratones de la jaula, así como la jaula y el material de cama se esterilizan antes de ser desechados o vueltos a usar.

Infección con LCMV (*virus de coriomeningitis linfocítica*)

Se sujeta al ratón exponiendo su abdomen y se le inyecta por vía intraperitoneal 2×10^5 pfu de LCMV Armstrong en 200 µL de RPMI o 2×10^6 pfu de LCMV Clona 13 in 200µL de RPMI. Se libera al ratón y se devuelve a su jaula. Los ratones de la jaula, así como la jaula y el material de cama se esterilizan antes de ser desechados o vueltos a usar.

Se anexan las normas de operación de Listeria y LCMV

José C. Crispín y Gabriela Sánchez Navarro realizarán estos procedimientos.

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

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
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.

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

No se espera que estos parámetros cambien durante el 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			



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

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

Las infecciones que se inducirán solamente causarían malestar general en los ratones de aproximadamente una semana de duración. No se espera que los ratones que se observarán desarrollen enfermedad espontánea. Sin embargo, los animales se observarán y se registrarán cambios en su comportamiento (aislamiento) y apariencia (pérdida de peso, piloerección). Si detectamos enfermedad en los ratones, manifestada por pérdida de peso moderada a grave (10-20%) o cambios en su comportamiento, se sacrificará al ratón. En otras palabras, 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

En base en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en qué 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

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

Asfixia con CO₂

17) ¿El protocolo representa riesgo biológico?

Si.

Los experimentos en los que se infecten ratones con *Listeria* o con LCMV se realizarán en el cuarto de BSL3 del DIEB a cargo del Dr. Rogelio Hernández Pando siguiendo las normas de operación de dicha área. Hemos hablado con él y nos ha dado su autorización para eso.

Los ratones infectados serán sacrificados en el bioterio, antes de salir del área BSL3. Los cadáveres, así como el material (jaulas y contenido) serán esterilizados por autoclave antes de salir del área BSL3.

Se seguirán las siguientes normas de operación:



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

Normas de operación para el manejo de Listeria

Cultivo de bacterias. La *Listeria monocytogenes* se creará en placas de agar-BHI (Brain Heart Infusion) y se escogerá una colonia para su expansión en medio BHI. Las bacterias se crearán en placas y frascos adecuadamente etiquetados en el laboratorio del Dr. Crispín en el Depto. de Inmunología y Reumatología del Instituto. Las suspensiones de bacterias concentrarán por centrifugación a una concentración de 10^9 u.f.c. y se congelarán a -80°C para su uso posterior. Todo el material usado, incluyendo la centrifuga y sus cubetas, se limpiarán con cloro 10% después de su uso con bacterias.

Inoculación de ratones. Las alícuotas se descongelarán y se diluirán 30,000 u.f.c./mL en PBS estéril. Alícuotas de 1.5 mL se transportarán del laboratorio del Dr. Crispín al cuarto BSL3 del DIEB. Los tubos con las alícuotas se sellarán con parafilm y se transportarán en un tubo de 50 mL cerrado. Se inyectarán 3000 u.f.c. en 100 μL de PBS a cada ratón por vía intravenosa (vena caudal). Los ratones se monitorizarán cada día y se sacrificará a los ratones que muestren datos de deterioro clínico. Se indicarán las jaulas que contienen ratones infectados con *Listeria*. Los ratones se sacrificarán y serán disecados en el cuarto BSL3. Asimismo, las jaulas, el material de cama y los cadáveres de los ratones serán esterilizados antes de salir del cuarto BSL3.

Normas de operación para el manejo de LCMV

Manejo del virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV). El virus se creará en células BHK (Baby Hamster Kidney) en cajas de cultivo adecuadamente etiquetadas en el laboratorio del Dr. Crispín. A los 3 días de la infección, se recogerá el sobrenadante, que se dividirá en alícuotas y se guardará a -80°C . El virus se titulará en un ensayo de placa usando células Vero.

Inoculación de ratones. Los ratones se infectarán con 2×10^5 u.f.p. (LCMV cepa Armstrong) o 2×10^6 u.f.p. (LCMV cepa clona 13) administrados en 200 μL de RPMI por vía intravenosa (vena caudal). Los ratones se monitorizarán cada día y se sacrificará a los ratones que muestren datos de deterioro clínico. Se indicarán las jaulas que contienen ratones infectados con LCMV. Los ratones se sacrificarán y serán disecados en el cuarto BSL3. Asimismo, las jaulas, el material de cama y los cadáveres de los ratones serán esterilizados antes de salir del cuarto BSL3.

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

Los cadáveres serán colocados dentro de una bolsa de plástico de color rojo resistente que será sometida a un ciclo de esterilización por vapor (121°C / 20 lb/in / 30 min). Una vez terminado el ciclo, la bolsa se colocará dentro de una bolsa de plástico amarilla impermeable con la leyenda "PELIGRO RESIDUOS BIOLÓGICOS-INFECTIOSOS". Se colocará en el depósito del INCMNSZ.

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.

Jorge Alcocer Varela

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 Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

**FORMATO DE EVALUACIÓN DE
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

No. de registro CIIBH:

IRE-1805-16/20-1

1. Título del proyecto

Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
ALCOCER VARELA, JORGE CARLOS	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable	2610	jalcocer@quetzal.innsz.mx
CRISPIN ACUÑA, JOSE CARLOS	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador asociado	2610	carlos.cripina@incmnsz.mx
CE	ESTUDIANTE DE DOCTORADO	Estudiante de posgrado	2610	Ø

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

Los Dres. Alcocer y Crispín son expertos en el estudio de la patogénesis del lupus eritematoso generalizado (LEG). El Dr. Crispín describió el papel de B55 β en la inducción de apoptosis de células T y su probable disfunción en pacientes con LEG (Crispín et al, PNAS 2011). El Dr. Crispín generó el ratón con deficiencia condicional de B55 β (*Ppp2r2b*) que se usará en este proyecto. Basado en lo anterior, los Dres. Alcocer y Crispín obtuvieron financiamiento para este proyecto que tiene por objeto determinar el papel de B55b en la terminación de la respuesta inmune. Gabriela Sánchez Navarro es una QFB que está preparándose para ingresar al doctorado bajo la tutela del Dr. Crispín.

3. Instituciones participantes

INCMNSZ

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

CONACyT

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

No

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

Importancia de la expansión y contracción del sistema inmune adaptativo. El sistema inmune adaptativo, está formado por linfocitos B y T, que generan receptores de antígeno a través de un mecanismo complejo que involucra el re-arreglo aleatorio de segmentos de genes [1]. Dicho proceso da lugar a un arsenal variado de linfocitos con receptores diversos. Aunque existen linfocitos específicos para prácticamente cualquier antígeno, la frecuencia de cada uno es muy baja, aproximadamente de 1 a 10 por 100,000 [2]. Por esa razón, cuando un linfocito encuentra su antígeno específico en presencia de señales que indican infección o peligro, éste se activa e inicia una respuesta proliferativa intensa en la que se expanden una o varias clonas capaces de eliminar al agente desencadenante. La magnitud de la expansión clonal es muy grande: en una semana, el número de células T-específicas puede aumentar hasta 50,000 veces [3, 4]. Una vez que el patógeno es neutralizado, la mayoría de las células generadas durante la respuesta son eliminadas, quedando solo algunas células de memoria. La contracción del sistema inmune y el retorno al estado basal permiten el restablecimiento de un repertorio variado y eliminan el riesgo de inflamación y autoinmunidad que los linfocitos activados implican [5]. Se conoce poco acerca de cómo se regula la contracción de la respuesta inmune, pero se ha propuesto que la progresiva escasez del antígeno desencadenante y de citocinas y factores de crecimiento son elementos claves [6]. Cómo las células T integran dichas señales para iniciar la apoptosis es un misterio, pero es claro que defectos en este proceso se asocian a enfermedades linfoproliferativas y autoinmunes [7].

Apoptosis de células T. La apoptosis es el mecanismo dominante de muerte celular programada en células T [5]. Durante la contracción de la respuesta inmune, la apoptosis se desencadena probablemente a través de la llamada "vía intrínseca", ya que defectos genéticos en miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (Bim, Puma, Bak, Bax) alteran la contracción clonal [8-12] y, en algunos casos, causan enfermedad autoinmune [13, 14]. La vía intrínseca de la apoptosis puede ser activada por una gran variedad de factores que incluyen la privación de IL-2 [15] y la baja concentración de otros factores de crecimiento [16].

La vía de señalización Akt-mTOR. La vía Akt-mTOR permite a las células adaptar su función de acuerdo a la abundancia de nutrientes y factores de crecimiento [17]. La activación de este sistema (en condiciones de abundancia) incrementa la síntesis de proteínas y el volumen celular; su inhibición, durante escasez de factores de crecimiento, detiene el ciclo celular y puede desencadenar apoptosis [16-18]. En las células T, esta vía contribuye además a modular el proceso de diferenciación que es inducido por estímulos externos (e.g. citocinas) [19-23].

La fosfatasa de proteínas 2A (PP2A) es un regulador de la inmunidad. PP2A es una fosfatasa de serina/treonina que modula un gran número de procesos celulares, incluyendo vías de señalización, ciclo celular y apoptosis [24]. Esta enzima consiste en un heterotrímero formado por una subunidad estructural (A), una catalítica (C) y una reguladora (B). Las subunidades A y C se expresan en todas las células como un heterodímero que se activa cuando la subunidad B se acopla a él. Existen más de 20 isoformas de B, pero solo una puede acoplarse a la vez al heterodímero A/C. La subunidad B determina la especificidad y localización intracelular de la holoenzima [25]. PP2A juega un papel funcional clave en células T y alteraciones en la misma se asocian con autoinmunidad. A este respecto, la expresión y función de la subunidad catalítica (PP2Ac) están incrementadas en células T de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) [26]. En trabajos previos demostramos que este fenómeno es patogénico ya que la sobreexpresión de PP2Ac aumenta la capacidad inflamatoria de las células T [27] y la susceptibilidad de desarrollar nefritis autoinmune [28] en un modelo murino transgénico.

La fosfatasa PP2A en células presentadoras de antígeno. Aun cuando las células presentadoras de antígeno (CPA) y en particular las células dendríticas (CDs) derivadas de la médula ósea tienen un papel fundamental en la activación y diferenciación de linfocitos T y en la generación de la respuesta inmune, poco se sabe sobre la función de PP2A en estas células. Sin embargo, se ha informado que PP2A se expresa en CDs de ratón, que es enzimáticamente activa y que participa en la regulación de la síntesis de IL-23 [29] y, por lo tanto, en la diferenciación de linfocitos Th17 [30]. No existen estudios realizados en CDs humanas sobre el posible papel de PP2A en su diferenciación, función y apoptosis.

En resumen, la contracción es un proceso fundamental en la homeostasis del sistema inmune. Existe información que implica a la IL-2 como un factor determinante en la duración de la respuesta inmune [15], pero se desconocen los mecanismos celulares y moleculares que permiten que la célula T interprete los niveles extracelulares de IL-2 y los integre con otras señales intrínsecas y ambientales para detener sus funciones efectoras e inducir la apoptosis. Este proyecto introduce a PP2A B55beta, una subunidad B de la fosfatasa PP2A, como un nodo regulador capaz de traducir estímulos ambientales, en particular la concentración de IL-2, en apoptosis a través de la modulación selectiva de la vía de señalización Akt-mTOR. Basados en observaciones preliminares que muestran una defectuosa inducción de B55beta en pacientes con LEG, proponemos a B55beta como un regulador de la duración de la respuesta inmune cuya disfunción contribuye al desarrollo de autoinmunidad. Asimismo, resulta de interés el dilucidar la expresión y función de la PP2A en CDs y su posible relación con la patogenia de enfermedades autoinmunes.

INFORMACIÓN PRELIMINAR

La IL-2 regula la vía de Akt-mTOR en células T. La vía de señalización Akt-mTOR permite a las células adaptar su metabolismo y crecimiento en base a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (**Fig. 1A**) [17]. En las células T, la concentración de IL-2 es una de las muchas señales ambientales capaces de activar a Akt y mTOR [23]. Así, la interacción de IL-2 con su receptor en células T induce la activación de S6, la cual es regulada por mTOR [31] (**Fig. 1B**). Para determinar si la ausencia de IL-2 tiene el efecto contrario que su administración, analizamos la fosforilación de Akt en los dos residuos que controlan su actividad (S473 y T308) [32], durante la privación de IL-2 en células T humanas activadas. Como se muestra en la **Fig. 1C**, la fosforilación de Akt, presente en las células activadas, desapareció una hora después de retirar la IL-2. Esta observación, que la privación de IL-2 causa inactivación de Akt en presencia de otros factores capaces de activarlo (e.g. nutrientes) indica que la ausencia de IL-2 causa la desfosforilación de Akt en forma activa. Esto es, que la desfosforilación no sucede como consecuencia de falta de fosforilación, sino por la inducción de un inhibidor capaz de contrarrestar la presencia de otros factores activadores.

La privación de IL-2 induce la expresión de B55beta. Describimos previamente [33] que la expresión de B55beta se modula durante la activación de células T humanas. Se expresa en niveles bajos en células quiescentes y desaparece rápidamente tras la activación celular. La privación de IL-2 causa su rápida inducción (**Fig. 2A**) en forma específica, ya que otros estímulos capaces de inducir apoptosis, por ejemplo la activación de Fas, no afectan su expresión [33].

El silenciamiento de B55beta protege a las células T de apoptosis por privación de IL-2. Con base a la cinética de expresión de B55beta, propusimos que su papel podría ser el de inducir apoptosis en células T cuando los niveles de IL-2 disminuyen. Para probar esta hipótesis, generamos lentivirus que codifican RNA interferente (shRNA) específico para *PPP2R2B*, el gen que codifica B55beta (**Fig. 2B**). A diferencia de las células T infectadas con lentivirus control, el silenciamiento de B55beta disminuyó significativamente la apoptosis inducida por privación de IL-2 (**Fig. 2C**). Estos resultados indican que B55beta desencadena apoptosis de células T cuando los niveles de IL-2 disminuyen. Este concepto es consistente con reportes previos que muestran que la apoptosis por privación de IL-2 requiere síntesis de proteínas [34] y es susceptible de ser bloqueada con inhibidores de fosfatasa [35].

B55beta modula la actividad de Akt. Para investigar si la desfosforilación de Akt inducida por privación de IL-2 es mediada por B55beta, usamos silenciamiento genético. Como se muestra en la **Fig. 3**, la ausencia de esta subunidad reguladora disminuye en forma significativa la desfosforilación de Akt inducida por el retiro de IL-2. En conjunto, nuestros datos indican que la disminución en la concentración de IL-2 induce la expresión de B55beta, que a su vez induce apoptosis al desfosforilar a Akt.

Defectos en la expresión de B55beta podrían contribuir a la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes. La contracción clonal, inducida, entre otros factores, por disminución en los niveles de IL-2, permite la terminación de la respuesta inmune. Defectos en este proceso podrían favorecer el desarrollo de autoinmunidad como muestran las deficiencias genéticas de miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 [13, 14] y como sugieren los defectos en apoptosis que se han reportado en pacientes con LEG [36-38]. A este respecto, analizamos la expresión de B55beta y la apoptosis en respuesta a privación de IL-2 y a un agonista de Fas en un grupo de pacientes con LEG. Encontramos que en las células T de aproximadamente la mitad de los pacientes con LEG, la inducción de B55beta y de apoptosis fue significativamente deficiente. En contraste, la apoptosis inducida a través de Fas ocurrió en forma normal [33]. Estos datos sugieren que alteraciones en la expresión y/o función de B55beta tienen repercusiones importantes en enfermedades autoinmunes humanas.

Generación de un ratón con deficiencia condicional de B55beta (Ppp2r2b). Con el fin de estudiar cuál es el papel de B55beta en un sistema in vivo, generamos un ratón en donde reemplazamos el 3er exón de *Ppp2r2b* y las regiones intrónicas adyacentes con un constructo que incluye un gen reportero (LacZ) y regiones de reconocimiento de la recombinasa Cre (**Fig. 5**). El diseño del constructo permite generar líneas de ratones con delección del gen en linajes celulares específicos (**Fig. 5**). Experimentos iniciales han demostrado que las células T de estos ratones efectivamente no expresan B55beta, pero que ésta se detecta en otras células (**Fig. 6A**). Asimismo, hemos corroborado que las células T de estos ratones son resistentes a la apoptosis inducida por privación de IL-2 (**Fig. 6B**).

DEFINICION DE PROBLEMAS:

Se desconocen los mecanismos celulares y moleculares que regulan la magnitud y duración de la expansión clonal linfóide durante respuestas inmunes agudas y crónicas. Alteraciones en estos procesos podrían contribuir al desarrollo y perpetuación de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Hemos generado información preliminar que indica que B55beta juega un papel clave en la terminación de la respuesta inmune.

El objetivo general de este proyecto es determinar qué papel juega B55beta en la regulación del sistema inmune y analizar si defectos en su expresión se asocian e enfermedades autoinmunes humanas o en modelos in vivo.

JUSTIFICACION :

Este proyecto está basado en el descubrimiento de B55B como una fosfatasa clave en la regulación del sistema inmune y será posible gracias a la participación de expertos de centros con una larga trayectoria en el estudio de la autoinmunidad. Las propuestas experimentales son factibles porque contamos con herramientas únicas (lentivirus para sobre-expresar y silenciar, un ratón con deficiencia condicional de B55B), que nos permitirán diseccionar el comportamiento de B55B en pacientes con EA, en estudios in vitro y en un modelo in vivo. Es importante enfatizar que el ratón que hemos desarrollado para este proyecto representa una herramienta única para estudiar la importancia de la terminación de la respuesta inmune en un modelo in vivo.

Los resultados de este proyecto tendrán implicaciones a varios niveles. En primer lugar, establecerán que una fosfatasa es un regulador clave de autoinmunidad. En segundo lugar, sentarán un nuevo paradigma en el estudio de la autoinmunidad humana, al demostrar la importancia patogénica de un defecto en la contracción de la respuesta inmune. En tercer lugar, diseccionarán una vía cuya manipulación permitirá la modulación de la duración de la respuesta inmune durante situaciones en las que su prolongación podría ser útil (e.g. vacunación). En cuarto lugar, identificarán moléculas susceptibles de ser blancos terapéuticos y biomarcadores.

6a. Hipótesis

En el apartado de ANTECEDENTES hemos mostrado información preliminar, en su mayoría generada por nosotros, que demuestra que: a) B55beta es una molécula clave para la iniciación de la apoptosis inducida en células T durante la privación de IL-2; b) B55beta induce apoptosis a través de modular la fosforilación de Akt; c) este proceso podría ser anómalo en pacientes con autoinmunidad.

Con base a esos puntos, hemos generado la hipótesis central del proyecto, que establece que **defectos en la terminación de la respuesta inmune causados por fallas en la expresión y/o función de B55beta en células T y células dendríticas contribuyen a la perpetuación de la respuesta inmune y a la etiopatogénesis de la autoinmunidad.**

En este proyecto proponemos una serie de experimentos que nos permitirán evaluar esta hipótesis usando un enfoque amplio, que incluirá el estudio de células humanas de personas sanas y de pacientes con enfermedades autoinmunes. En forma complementaria estudiaremos un modelo murino único, en donde podremos analizar los efectos de la deficiencia de B55beta en diferentes linajes celulares, durante el estado basal así como bajo estimulación antigénica de corta y larga duración.

Consideramos que este proyecto de vanguardia establecerá que B55beta es un regulador clave de la duración de la respuesta inmune y definirá su papel en la patogénesis de enfermedades

autoinmunes humanas. Además, este proyecto revelará, por vez primera, el papel del sistema Akt-mTOR en el control de la terminación de la respuesta inmune. Asimismo, contribuirá al conocimiento de un área de la inmunología que ha sido difícil de estudiar por falta de modelos adecuados. También consideramos que los resultados del proyecto abrirán la puerta a la modulación de Akt como una estrategia terapéutica en enfermedades autoinmunes. Dado que existen nuevos fármacos que inhiben Akt, desarrollados para tratar enfermedades oncológicas, los conceptos generados por el proyecto sentarán las bases para el uso de un nuevo tipo de medicamento en pacientes con enfermedades autoinmunes.

6b. Objetivos.

General:

Determinar si existe un defecto en la terminación de la respuesta inmune en pacientes con enfermedades autoinmunes y evaluar la contribución de B55B al mantenimiento de la tolerancia inmunológica.

Específicos:

Analizar el proceso de contracción clonal en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes.

Estudiar la expresión y función de B55beta en células dendríticas

Estudiar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en un modelo in vivo.

7. Metodología: Diseño general.

El presente es un proyecto de investigación biomédica, experimental transversal, abierto. No se realizará ninguna maniobra experimental en pacientes.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1. Analizar el proceso de contracción clonal en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes. Esta parte del proyecto se ha diseñado para investigar si, a nivel de células T, la terminación de la respuesta inmune sucede en forma normal en pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas. Investigaremos la frecuencia con la que se observan defectos de contracción clonal en diferentes enfermedades y si dichos defectos se asocian a inducción deficiente de B55beta.

1.1. Determinar la prevalencia de defectos en apoptosis inducida por privación de IL-2 en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes. Usaremos el superantígeno SEB (enterotoxina B de estafilococo) para estimular a células T de pacientes con enfermedades autoinmunes y controles. La SEB activa a ~20% de las células T [40], lo cual nos permitirá comparar la expansión y contracción de clonas que responden a SEB (identificadas con anticuerpos contra la cadena beta del TCR) y usar como control interno a células que no son activadas por SEB. Se aislarán células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 25 pacientes con LEG, 25 pacientes con AR, 25 pacientes con SS y 25 controles sanos. Este tamaño de muestra se calculó considerando la frecuencia con la que se reportamos defectos en la apoptosis de células T activadas de pacientes con LEG en un estudio previo [33]. La apoptosis se cuantificará por citometría de flujo (anexina V y yoduro de propidio), 24 y 48 horas después del retiro de IL-2.

1.2. Cuantificar la frecuencia de defectos en la inducción de B55beta en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes. Usaremos PCR de tiempo real para medir la inducción de B55beta. Para esto, aislaremos RNA del cultivo de CMSP en 3 tiempos: antes de la privación de

IL-2, a las 6 horas y a las 24 horas. Se cuantificará el incremento a las 6 y 24 horas en relación al basal.

1.3. Investigar si la inducción defectuosa de B55beta representa un defecto fijo o adquirido. Es posible que la resistencia a la inducción de B55beta y la consecuente resistencia a apoptosis representen un defecto adquirido por clonas de células T que se activan crónicamente o en presencia de mediadores de inflamación. Para distinguir entre estas posibilidades usaremos estrategias complementarias. En primer lugar, activaremos células T de donadores sanos durante diferentes periodos de tiempo con el fin de evaluar si la activación prolongada resulta en resistencia a la apoptosis. En segundo lugar, las activaremos en presencia de citocinas inflamatorias (e.g. IL-6, TNF-alfa) para determinar si su presencia confiere resistencia a la apoptosis.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2. Estudiar la expresión y función de B55beta en células dendríticas (CDs). Existe muy poca información de cómo se regula la supervivencia de CDs en condiciones de salud y de enfermedad autoinmune. Información generada por nuestro grupo y por otros laboratorios indica que PP2A es una molécula altamente conservada, de expresión ubicua, que regula procesos celulares fundamentales como ciclo celular y apoptosis [25, 33]. En este objetivo, analizaremos la expresión y función de B55beta en CDs y determinaremos si, como en otras células, B55beta regula la inducción de apoptosis. Después, estudiaremos si su expresión y función es normal en pacientes con enfermedades autoinmunes.

2.1. Analizar la expresión y función de B55beta en CDs de individuos sanos. Uno de los factores que regulan la supervivencia de las CDs es la concentración de citocinas que activan la vía de PI3K-Akt-mTOR (e.g. GM-CSF) [41, 42]. B55beta induce apoptosis al inactivar esta vía (Crispín et al., en preparación), por lo tanto es posible que regule la supervivencia de CDs como en células T. Para investigar esto, analizaremos la expresión de B55beta en CDs mieloides aisladas de sangre periférica de individuos sanos. El análisis se realizará con PCR, en células recién aisladas y a las 24 horas de cultivo en presencia y ausencia de GM-CSF. Esto nos permitirá determinar si B55beta se expresa constitutivamente, o si su expresión es inducible en ausencia de citocinas. En forma simultánea, diferenciaremos CDs a partir de monocitos (moCDs) [43] con el fin de determinar si el patrón de expresión de B55beta es similar al que se observa en CDs aisladas de sangre.

2.2. Determinar si la expresión de B55beta es normal en CDs de pacientes con enfermedades autoinmunes. Si los experimentos del apartado 2.1 indican que la expresión y función de B55beta es similar en CDs diferenciadas in vitro y aisladas de sangre, en este apartado trabajaremos con moCDs. Así, diferenciaremos CDs in vitro y estudiaremos si la expresión de B55beta y su cinética de muerte celular (espontánea e inducida a través de Fas) es normal en pacientes con LEG, AR y síndrome de Sjögren.

2.3. Estudiar las consecuencias funcionales de defectos en la expresión de B55beta en CDs. La falla en la expresión de B55beta podría causar la acumulación de CDs activadas con vida anormalmente larga. Usaremos siRNA para silenciar la expresión de B55beta en moCDs de individuos sanos para investigar si la disminución en la expresión de B55beta alarga la vida de las mismas. Asimismo, evaluaremos mediante citometría de flujo la expresión de marcadores de activación y moléculas coestimuladoras (e.g. CD40, CD80, CD86, etc) en CDs transfectadas

con siRNA control y específico para B55beta. Por último, analizaremos si el silenciamiento de B55beta aumenta la capacidad de estimular a células T alogénicas.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3. Estudiar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en un modelo in vivo. Hemos generado un ratón con el tercer exón del gen que codifica para B55beta (*Ppp2r2b*) flanqueado por secuencias que reconoce la recombinasa de ADN Cre (**Fig. 5**). Dicho exón es removido por Cre, específicamente en las células en donde se expresa la recombinasa. Usaremos ratones transgénicos que expresan la recombinasa en tipos celulares específicos para crear líneas murinas que carezcan de la expresión de B55beta en diferentes células. Esto nos permitirá evaluar la función de B55beta en células T y en CD, durante respuestas inmunes normales y durante el desarrollo de autoinmunidad.

3.1. Analizar las consecuencias de la ausencia de B55beta en células hematopoyéticas. Como estrategia inicial, generaremos una línea de ratones que carezca de B55beta en todas las células hematopoyéticas. Esto se logrará al cruzar el ratón con deficiencia condicional con un ratón que expresa Cre asociado al promotor de Vav [44]. Esta estrategia nos permitirá evaluar las funciones del gen en forma global, en todas las células del sistema inmune.

3.1.1. Determinar si la ausencia de B55beta causa enfermedad autoinmune. Con el fin de determinar si la ausencia de B55beta causa autoinmunidad, vigilarémos a 3 cohortes de ratones de la cepa C57BL/6 durante un año: a) B55beta presente; b) deficiencia heterocigota; c) deficiencia homocigota. Cada mes buscaremos proteinuria, presencia de anticuerpos antinucleares, y mediremos la frecuencia de células T activadas (CD44⁺ CD62L⁻) en sangre periférica. Si los ratones no desarrollan enfermedad en forma espontánea, serán sacrificados al año de edad y sus órganos serán analizados en busca de signos de inflamación. Si los ratones se enferman antes, serán sacrificados y analizados en diferentes momentos.

3.1.2. Estudiar si la ausencia de B55beta altera la contracción de células T. Como experimento inicial, inyectaremos SEB a los ratones. Esto causa la expansión de algunas clonas de células T. Mediremos la frecuencia de las células T CD4 y CD8 que responden a SEB (Vbeta8) a lo largo de 2 semanas para observar su expansión y contracción. Compararemos esta cinética en ratones con y sin B55beta. Para el siguiente experimento, cruzaremos a los ratones deficientes en B55beta con ratones OT-I y OT-II (que expresan un receptor de células T específico para péptidos derivados de ovoalbúmina presentados por moléculas de clase I y II, respectivamente). Infectaremos a estos ratones con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbúmina y estudiaremos la expansión y contracción de las clonas de células T CD8 y CD4, respectivamente [45].

3.2. Analizar los efectos de la deficiencia selectiva de B55beta en células T. Con el fin de diseccionar cuál es la función de B55beta en células T y para identificar las consecuencias de la falla en la terminación de la respuesta inmune en células T, cruzaremos el ratón con deficiencia condicional de B55beta con un ratón que expresa Cre bajo el promotor de CD4 [46]. Estudiaremos: a) si la activación, proliferación, y diferenciación funcional de las células T es normal; b) si la deficiencia selectiva de B55beta en células T causa enfermedad autoinmune; c) la cinética de expansión y contracción clonal durante infección por *L. monocytogenes*.

3.3. Evaluar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en CDs mieloides. En forma análoga a los experimentos del objetivo 3.2, cruzaremos el ratón deficiente de B55beta con un ratón CD11c-Cre [47] y evaluaremos el desarrollo de autoinmunidad y la cinética de expansión y contracción clonal durante infección sistémica. Además evaluaremos si el número y el fenotipo de las CDs es normal.

3.4 Analizar la expresión de B55beta durante respuestas inmunes agudas y crónicas. Usaremos el ratón reportero en donde las células que expresan B55beta expresarán LacZ. Infectaremos a los ratones reporteros con dos cepas del virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) que causan una infección aguda (Armstrong) y crónica (clona 13) [48]. Durante la infección aguda, analizaremos por citometría de flujo e inmunohistoquímica (REF) la expresión de B55beta (LacZ) en el bazo los días 0 (antes de la infección), 2, 5, 7, 14 y 21. La citometría de flujo permitirá identificar con mayor facilidad qué células expresan B55beta. La inmunohistoquímica revelará en qué estructuras anatómicas (e.g. centros germinales) se expresa. Durante la infección con la cepa LCMV clona 13 que causa infección crónica, analizaremos la expresión antes de la infección y a las semanas 1, 2, 4, 8, 12 y 24.

El número de pacientes que se estudiará se calculó en base a un trabajo previo en donde analizamos la expresión de B55beta en células T de pacientes con LEG [33]. En dicho trabajo mostramos que la expresión de B55beta, inducida por 48 horas de privación de IL-2, es un fenómeno poco variable en individuos sanos y pacientes con LEG (la desviación estándar fue de 0.8 y 1.1, respectivamente). En base a las diferencias entre pacientes y controles y en base a la poca variabilidad en cada grupo, hemos calculado que una muestra de 25 pacientes y 25 controles nos permitirán realizar el estudio, asumiendo un error alfa de 0.05 y un poder de 0.90.

Los pacientes serán reclutados de la consulta externa de reumatología y de los servicios de hospitalización del INCMNSZ. Los pacientes que elijan participar firmarán un consentimiento informado. Como controles sanos se considerarán individuos de la misma edad (± 5 años) y sexo que los pacientes. Se invitará a participar como controles a familiares de los pacientes. Los individuos que participen como controles también firmarán consentimiento informado.

8. Metodología: Criterios de selección

Pacientes: Pacientes con LEG, AR, o síndrome de Sjögren primario que cumplan con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR) serán reclutados en forma consecutiva. Se incluirá a todos los pacientes sin importar su tratamiento. Se incluirá a pacientes con enfermedad activa e inactiva, sin importar el tipo de manifestaciones clínicas que tengan o hayan tenido.

Controles: Personas sanas, pareadas por sexo y edad (± 5 años) serán reclutadas como controles.

Todos los pacientes y controles serán adultos y firmarán formas de consentimiento informado, y estarán libres de infecciones actuales.

9. Metodología: Desenlaces y variables

Objetivos específicos 1 y 2.

Apoptosis. Se cuantificará el porcentaje de células apoptóticas en cultivos de células T por medio de citometría de flujo. Se considerarán apoptóticas a las células que unen Anexina V sin ser permeables a yoduro de propidio.

Inducción de B55beta. Se medirá por medio de PCR cuantitativo. Se compararán los niveles antes y después de someter a las células a privación de IL-2. Los niveles de GAPDH se usarán como control.

Objetivo específico 3.

Apoptosis e inducción de B55beta. Se medirán de la misma manera que en células humanas.

Proteinuria. Se cuantificará albúmina por medio de ELISA en muestras de orina. Se normalizará el resultado contra la creatinina urinaria.

Anticuerpos antinucleares. Se medirán por medio de inmunofluorescencia indirecta en células HEp-2.

Fenotipificación de células T y dendríticas. Se medirá la expresión de diversas moléculas por medio de citometría de flujo. Los resultados se expresarán como porcentaje de células positivas.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

Ninguno

BENEFICIOS INDIRECTOS:

Todo lo que deriva de entender mejor la enfermedad de un paciente: mejores modelos conceptuales, mejor diseño de terapias, identificación de biomarcadores y blancos terapéuticos, etc.

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : Aquellas derivadas de la venopunción

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : Equimosis en el sitio de venopunción

EFFECTOS ADVERSOS : No aplica

EFFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguno

METODOS DE SEGURIDAD : No aplica

PROCEDIMIENTOS : No aplica

OTRO TIPO DE RIESGO : No aplica

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACION	
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.

- 1 Mallick, C. A., Dudley, E. C., Viney, J. L., Owen, M. J. and Hayday, A. C., Rearrangement and diversity of T cell receptor beta chain genes in thymocytes: a critical role for the beta chain in development. *Cell* 1993. 73: 513-519.
- 2 Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H. K., Hasan, M. and Albert, M. L., Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* 2010. 115: 3718-3725.
- 3 Blattman, J. N., Antia, R., Sourdive, D. J., Wang, X., Kaech, S. M., Murali-Krishna, K., Altman, J. D. and Ahmed, R., Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J.Exp.Med.* 2002. 195: 657-664.
- 4 Masopust, D., Murali-Krishna, K. and Ahmed, R., Quantitating the magnitude of the lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8 T-cell response: it is even bigger than we thought. *J.Virol.* 2007. 81: 2002-2011.
- 5 Hedrick, S. M., Chen, I. L. and Alves, B. N., Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. *Immunol Rev.* 2010. 236: 41-53.
- 6 Marrack, P., Scott-Browne, J. and Macleod, M. K., Terminating the immune response. *Immunol Rev.* 2010. 236: 5-10.
- 7 Strasser, A., The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat.Rev.Immunol* 2005. 5: 189-200.
- 8 Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J. and Marrack, P., Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity.* 2002. 16: 759-767.
- 9 Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P. and Strasser, A., Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003. 100: 14175-14180.
- 10 Wojciechowski, S., Jordan, M. B., Zhu, Y., White, J., Zajac, A. J. and Hildeman, D. A., Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. *Eur.J.Immunol* 2006. 36: 1694-1706.
- 11 Bauer, A., Villunger, A., Labi, V., Fischer, S. F., Strasser, A., Wagner, H., Schmid, R. M. and Hacker, G., The NF-kappaB regulator Bcl-3 and the BH3-only proteins Bim and Puma control the death of activated T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006. 103: 10979-10984.
- 12 Fischer, S. F., Belz, G. T. and Strasser, A., BH3-only protein Puma contributes to death of antigen-specific T cells during shutdown of an immune response to acute viral infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008. 105: 3035-3040.
- 13 Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D. L., Bath, M. L., Adams, J. M., Cory, S. and Harris, A. W., Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991. 88: 8661-8665.
- 14 Hutcheson, J., Scatizzi, J. C., Siddiqui, A. M., Haines, G. K., III, Wu, T., Li, Q. Z., Davis, L. S., Mohan, C. and Perlman, H., Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity.* 2008. 28: 206-217.
- 15 Lenardo, M., Chan, K. M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J. and Zheng, L., Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu.Rev.Immunol* 1999. 17: 221-253.
- 16 Hung, C. M., Garcia-Haro, L., Sparks, C. A. and Guertin, D. A., mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* 2012. 4.
- 17 Laplante, M. and Sabatini, D. M., mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012. 149: 274-293.
- 18 Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E., Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999. 13: 2905-2927.

- 19 Delgoffe, G. M., Kole, T. P., Zheng, Y., Zarek, P. E., Matthews, K. L., Xiao, B., Worley, P. F., Kozma, S. C. and Powell, J. D., The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity*. 2009. 30: 832-844.
- 20 Procaccini, C., De, R., V, Galgani, M., Abanni, L., Cali, G., Porcellini, A., Carbone, F., Fontana, S., Horvath, T. L., La, C. A. and Matarese, G., An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness. *Immunity*. 2010. 33: 929-941.
- 21 Lee, K., Gudapati, P., Dragovic, S., Spencer, C., Joyce, S., Killeen, N., Magnuson, M. A. and Boothby, M., Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity*. 2010. 32: 743-753.
- 22 Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S. and Koyasu, S., PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of RORgamma. *Cell Rep*. 2012. 1: 360-373.
- 23 Chi, H., Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat.Rev.Immunol* 2012. 12: 325-338.
- 24 Shi, Y., Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 2009. 139: 468-484.
- 25 Janssens, V., Longin, S. and Goris, J., PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem.Sci*. 2008. 33: 113-121.
- 26 Katsiari, C. G., Kyttaris, V. C., Juang, Y. T. and Tsokos, G. C., Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 2005. 115: 3193-3204.
- 27 Apostolidis, S. A., Rauen, T., Hedrich, C. M., Tsokos, G. C. and Crispin, J. C., Protein phosphatase 2A enables expression of interleukin 17 (IL-17) through chromatin remodeling. *J Biol Chem* 2013. 288: 26775-26784.
- 28 Crispin, J. C., Apostolidis, S. A., Rosetti, F., Keszei, M., Wang, N., Terhorst, C., Mayadas, T. N. and Tsokos, G. C., Cutting edge: protein phosphatase 2A confers susceptibility to autoimmune disease through an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 2012. 188: 3567-3571.
- 29 Chang, J., Voorhees, T. J., Liu, Y., Zhao, Y. and Chang, C. H., Interleukin-23 production in dendritic cells is negatively regulated by protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010. 107: 8340-8345.
- 30 Endong, L., Shijie, J., Sonobe, Y., Di, M., Hua, L., Kawanokuchi, J., Mizuno, T. and Suzumura, A., The gap-junction inhibitor carbenoxolone suppresses the differentiation of Th17 cells through inhibition of IL-23 expression in antigen presenting cells. *J Neuroimmunol* 2011. 240-241: 58-64.
- 31 Hay, N. and Sonenberg, N., Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004. 18: 1926-1945.
- 32 Hart, J. R. and Vogt, P. K., Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget*. 2011. 2: 467-476.
- 33 Crispin, J. C., Apostolidis, S. A., Finnell, M. I. and Tsokos, G. C., Induction of PP2A Bbeta, a regulator of IL-2 deprivation-induced T-cell apoptosis, is deficient in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011. 108: 12443-12448.
- 34 Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, M. and Mantovani, A., Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J.Biol.Chem*. 1992. 267: 18278-18283.
- 35 Weller, M., Malipiero, U., Groscurth, P. and Fontana, A., T cell apoptosis induced by interleukin-2 deprivation or transforming growth factor-beta 2: modulation by the phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A. *Exp.Cell Res*. 1995. 221: 395-403.
- 36 Kovacs, B., Vassilopoulos, D., Vogelgesang, S. A. and Tsokos, G. C., Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol* 1996. 81: 293-302.
- 37 Xu, L., Zhang, L., Yi, Y., Kang, H. K. and Datta, S. K., Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med* 2004. 10: 411-415.
- 38 Gergely, P., Jr., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., Banki, K., Phillips, P. E. and Perl, A., Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002. 46: 175-190.
- 39 Chen, M., Wang, Y. H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y. J. and Wang, J., Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 2006. 311: 1160-1164.
- 40 Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E. W., Bigler, R. D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D. N., Choi, Y. and Marrack, P., V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989. 244: 811-813.

41 Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R. and Ricciardi-Castagnoli, P., Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. <i>J Exp Med</i> 1998. 188: 2175-2180.
42 Woltman, A. M., van der Kooij, S. W., Coffey, P. J., Offringa, R., Daha, M. R. and van Kooten, C., Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. <i>Blood</i> 2003. 101: 1439-1445.
43 Crispin, J. C., Vargas-Rojas, M. I., Monsivais-Urenda, A. and Alcocer-Varela, J., Phenotype and function of dendritic cells of patients with systemic lupus erythematosus. <i>Clin Immunol</i> 2012. 143: 45-50.
44 Georgiades, P., Ogilvy, S., Duval, H., Licence, D. R., Charnock-Jones, D. S., Smith, S. K. and Print, C. G., VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. <i>Genesis</i> 2002. 34: 251-256.
45 Rodriguez-Rodriguez, N., Apostolidis, S. A., Penaloza-MacMaster, P., Martín Villa, J. M., Barouch, D. H., Tsokos, G. C. and Crispin, J. C., Programmed Cell Death 1 and Helios Distinguish TCR-alpha-beta+ Double-Negative (CD4-CD8-) T Cells That Derive from Self-Reactive CD8 T Cells. <i>J Immunol</i> 2015.
46 Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, A., Jaenisch, R. and Wilson, C. B., A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. <i>Immunity</i> 2001. 15: 763-774.
47 Vander Lugt, B., Khan, A. A., Hackney, J. A., Agrawal, S., Lesch, J., Zhou, M., Lee, W. P., Park, S., Xu, M., DeVoss, J., Spooner, C. J., Chalouni, C., Delamarre, L., Mellman, I. and Singh, H., Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation. <i>Nat Immunol</i> 2014. 15: 161-167.
48 Althaus, C. L., Ganusov, V. V. and De Boer, R. J., Dynamics of CD8+ T cell responses during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. <i>J Immunol</i> 2007. 179: 2944-2951.
49 McKinney, E. F., Lee, J. C., Jayne, D. R., Lyons, P. A. and Smith, K. G., T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. <i>Nature</i> 2015. 523: 612-616.

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

**FORMATO DE EVALUACIÓN DE
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

No. de registro CIIBH:

IRE-1805-16/20-1

1. Título del proyecto

Mecanismos que limitan la duración de la respuesta inmune y su participación en el desarrollo de la autoinmunidad

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
ALCOCER VARELA JORGE CARLOS	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable		jalcocer@quetzal.innsz.mx
CRISPIN ACUÑA JOSE CARLOS	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador asociado		

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:

Importancia de la expansión y contracción del sistema inmune adaptativo. El sistema inmune adaptativo, está formado por linfocitos B y T, que generan receptores de antígeno a través de un mecanismo complejo que involucra el re-arreglo aleatorio de segmentos de genes [1]. Dicho proceso da lugar a un arsenal variado de linfocitos con receptores diversos. Aunque existen linfocitos específicos para prácticamente cualquier antígeno, la frecuencia de cada uno es muy baja, aproximadamente de 1 a 10 por 100,000 [2]. Por esa razón, cuando un linfocito encuentra su antígeno específico en presencia de señales que indican infección o peligro, éste se activa

e inicia una respuesta proliferativa intensa en la que se expanden una o varias clonas capaces de eliminar al agente desencadenante. La magnitud de la expansión clonal es muy grande: en una semana, el número de células T específicas puede aumentar hasta 50,000 veces [3, 4]. Una vez que el patógeno es neutralizado, la mayoría de las células generadas durante la respuesta son eliminadas, quedando solo algunas células de memoria. La contracción del sistema inmune y el retorno al estado basal permiten el restablecimiento de un repertorio variado y eliminan el riesgo de inflamación y autoinmunidad que los linfocitos activados implican [5]. Se conoce poco acerca de cómo se regula la contracción de la respuesta inmune, pero se ha propuesto que la progresiva escasez del antígeno desencadenante y de citocinas y factores de crecimiento son elementos claves [6]. Cómo las células T integran dichas señales para iniciar la apoptosis es un misterio, pero es claro que defectos en este proceso se asocian a enfermedades linfoproliferativas y autoinmunes [7].

Apoptosis de células T. La apoptosis es el mecanismo dominante de muerte celular programada en células T [5]. Durante la contracción de la respuesta inmune, la apoptosis se desencadena probablemente a través de la llamada "vía intrínseca", ya que defectos genéticos en miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (Bim, Puma, Bak, Bax) alteran la contracción clonal [8-12] y, en algunos casos, causan enfermedad autoinmune [13, 14]. La vía intrínseca de la apoptosis puede ser activada por una gran variedad de factores que incluyen la privación de IL-2 [15] y la baja concentración de otros factores de crecimiento [16].

La vía de señalización Akt-mTOR. La vía Akt-mTOR permite a las células adaptar su función de acuerdo a la abundancia de nutrientes y factores de crecimiento [17]. La activación de este sistema (en condiciones de abundancia) incrementa la síntesis de proteínas y el volumen celular; su inhibición, durante escasez de factores de crecimiento, detiene el ciclo celular y puede desencadenar apoptosis [16-18]. En las células T, esta vía contribuye además a modular el proceso de diferenciación que es inducido por estímulos externos (e.g. citocinas) [19-23].

La fosfatasa de proteínas 2A (PP2A) es un regulador de la inmunidad. PP2A es una fosfatasa de serina/treonina que modula un gran número de procesos celulares, incluyendo vías de señalización, ciclo celular y apoptosis [24]. Esta enzima consiste en un heterotrímero formado por una subunidad estructural (A), una catalítica (C) y una reguladora (B). Las subunidades A y C se expresan en todas las células como un heterodímero que se activa cuando la subunidad B se acopla a él. Existen más de 20 isoformas de B, pero solo una puede acoplarse a la vez al heterodímero A/C. La subunidad B determina la especificidad y localización intracelular de la holoenzima [25]. PP2A juega un papel funcional clave en células T y alteraciones en la misma se asocian con autoinmunidad. A este respecto, la expresión y función de la subunidad catalítica (PP2Ac) están incrementadas en células T de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) [26]. En trabajos previos demostramos que este fenómeno es patogénico ya que la sobreexpresión de PP2Ac aumenta la capacidad inflamatoria de las células T [27] y la susceptibilidad de desarrollar nefritis autoinmune [28] en un modelo murino transgénico.

La fosfatasa PP2A en células presentadoras de antígeno. Aun cuando las células presentadoras de antígeno (CPA) y en particular las células dendríticas (CDs) derivadas de la médula ósea tienen un papel fundamental en la activación y diferenciación de linfocitos T y en la generación de la respuesta inmune, poco se sabe sobre la función de PP2A en estas células. Sin embargo, se ha informado que PP2A se expresa en CDs de ratón, que es enzimáticamente activa y que participa en la regulación de la síntesis de IL-23 [29] y, por lo tanto, en la

diferenciación de linfocitos Th17 [30]. No existen estudios realizados en CD4 humanas sobre el posible papel de PP2A en su diferenciación, función y apoptosis.

En resumen, la contracción es un proceso fundamental en la homeostasis del sistema inmune. Existe información que implica a la IL-2 como un factor determinante en la duración de la respuesta inmune [15], pero se desconocen los mecanismos celulares y moleculares que permiten que la célula T interprete los niveles extracelulares de IL-2 y los integre con otras señales intrínsecas y ambientales para detener sus funciones efectoras e inducir la apoptosis. Este proyecto introduce a B55beta, una subunidad B de la fosfatasa PP2A, como un nodo regulador capaz de traducir estímulos ambientales, en particular la concentración de IL-2, en apoptosis a través de la modulación selectiva de la vía de señalización Akt-mTOR. Basados en observaciones preliminares que muestran una defectuosa inducción de B55beta en pacientes con LEG, proponemos a B55beta como un regulador de la duración de la respuesta inmune cuya disfunción contribuye al desarrollo de autoinmunidad. Asimismo, resulta de interés el dilucidar la expresión y función de la PP2A en CD4 y su posible relación con la patogenia de enfermedades autoinmunes.

INFORMACIÓN PRELIMINAR

La IL-2 regula la vía de Akt-mTOR en células T. La vía de señalización Akt-mTOR permite a las células adaptar su metabolismo y crecimiento en base a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (**Fig. 1A**) [17]. En las células T, la concentración de IL-2 es una de las muchas señales ambientales capaces de activar a Akt y mTOR [23]. Así, la interacción de IL-2 con su receptor en células T induce la activación de S6, la cual es regulada por mTOR [31] (**Fig. 1B**). Para determinar si la ausencia de IL-2 tiene el efecto contrario que su administración, analizamos la fosforilación de Akt en los dos residuos que controlan su actividad (S473 y T308) [32], durante la privación de IL-2 en células T humanas activadas. Como se muestra en la **Fig. 1C**, la fosforilación de Akt, presente en las células activadas, desapareció una hora después de retirar la IL-2. Esta observación, que la privación de IL-2 causa inactivación de Akt en presencia de otros factores capaces de activarlo (e.g. nutrientes) indica que la ausencia de IL-2 causa la desfosforilación de Akt en forma activa. Esto es, que la desfosforilación no sucede como consecuencia de falta de fosforilación, sino por la inducción de un inhibidor capaz de contrarrestar la presencia de otros factores activadores.

La privación de IL-2 induce la expresión de B55beta. Describimos previamente [33] que la expresión de B55beta se modula durante la activación de células T humanas. Se expresa en niveles bajos en células quiescentes y desaparece rápidamente tras la activación celular. La privación de IL-2 causa su rápida inducción (**Fig. 2A**) en forma específica, ya que otros estímulos capaces de inducir apoptosis, por ejemplo la activación de Fas, no afectan su expresión [33].

El silenciamiento de B55beta protege a las células T de apoptosis por privación de IL-2. Con base a la cinética de expresión de B55beta, propusimos que su papel podría ser el de inducir apoptosis en células T cuando los niveles de IL-2 disminuyen. Para probar esta hipótesis, generamos lentivirus que codifican RNA interferente (shRNA) específico para *PPP2R2B*, el gen que codifica B55beta (**Fig. 2B**). A diferencia de las células T infectadas con lentivirus control, el silenciamiento de B55beta disminuyó significativamente la apoptosis inducida por privación de IL-2 (**Fig. 2C**). Estos resultados indican que B55beta desencadena apoptosis de células T

cuando los niveles de IL-2 disminuyen. Este concepto es consistente con reportes previos que muestran que la apoptosis por privación de IL-2 requiere síntesis de proteínas [34] y es susceptible de ser bloqueada con inhibidores de fosfatasa [35].

B55beta modula la actividad de Akt. Para investigar si la desfosforilación de Akt inducida por privación de IL-2 es mediada por B55beta, usamos silenciamiento genético. Como se muestra en la **Fig. 3**, la ausencia de esta subunidad reguladora disminuye en forma significativa la desfosforilación de Akt inducida por el retiro de IL-2. En conjunto, nuestros datos indican que la disminución en la concentración de IL-2 induce la expresión de B55beta, que a su vez induce apoptosis al desfosforilar a Akt.

Defectos en la expresión de B55beta podrían contribuir a la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes. La contracción clonal, inducida, entre otros factores, por disminución en los niveles de IL-2, permite la terminación de la respuesta inmune. Defectos en este proceso podrían favorecer el desarrollo de autoinmunidad como muestran las deficiencias genéticas de miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 [13, 14] y como sugieren los defectos en apoptosis que se han reportado en pacientes con LEG [36-38]. A este respecto, analizamos la expresión de B55beta y la apoptosis en respuesta a privación de IL-2 y a un agonista de Fas en un grupo de pacientes con LEG. Encontramos que en las células T de aproximadamente la mitad de los pacientes con LEG, la inducción de B55beta y de apoptosis fue significativamente deficiente. En contraste, la apoptosis inducida a través de Fas ocurrió en forma normal [33]. Estos datos sugieren que alteraciones en la expresión y/o función de B55beta tienen repercusiones importantes en enfermedades autoinmunes humanas.

Generación de un ratón con deficiencia condicional de B55beta (Ppp2r2b). Con el fin de estudiar cuál es el papel de B55beta en un sistema in vivo, generamos un ratón en donde reemplazamos el 3er exón de *Ppp2r2b* y las regiones intrónicas adyacentes con un constructo que incluye un gen reportero (LacZ) y regiones de reconocimiento de la recombinasa Cre (**Fig. 5**). El diseño del constructo permite generar líneas de ratones con delección del gen en linajes celulares específicos (**Fig. 5**). Experimentos iniciales han demostrado que las células T de estos ratones efectivamente no expresan B55beta, pero que ésta se detecta en otras células (**Fig. 6A**). Asimismo, hemos corroborado que las células T de estos ratones son resistentes a la apoptosis inducida por privación de IL-2 (**Fig. 6B**).

DEFINICION DE PROBLEMAS:

Se desconocen los mecanismos celulares y moleculares que regulan la magnitud y duración de la expansión clonal linfoide durante respuestas inmunes agudas y crónicas. Alteraciones en estos procesos podrían contribuir al desarrollo y perpetuación de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Hemos generado información preliminar que indica que B55beta juega un papel clave en la terminación de la respuesta inmune.

El objetivo general de este proyecto es determinar qué papel juega B55beta en la regulación del sistema inmune y analizar si defectos en su expresión se asocian e enfermedades autoinmunes humanas o en modelos in vivo.

JUSTIFICACION :

Este proyecto está basado en el descubrimiento de B55B como una fosfatasa clave en la regulación del sistema inmune y será posible gracias a la participación de expertos de centros con una larga trayectoria en el estudio de la autoinmunidad. Las propuestas experimentales son factibles porque contamos con herramientas únicas (lentivirus para sobre-expresar y silenciar, un ratón con deficiencia condicional de B55B), que nos permitirán diseccionar el comportamiento de B55B en pacientes con EA, en estudios in vitro y en un modelo in vivo. Es importante enfatizar que el ratón que hemos desarrollado para este proyecto representa una herramienta única para estudiar la importancia de la terminación de la respuesta inmune en un modelo in vivo.

Los resultados de este proyecto tendrán implicaciones a varios niveles. En primer lugar, establecerán que una fosfatasa es un regulador clave de autoinmunidad. En segundo lugar, sentarán un nuevo paradigma en el estudio de la autoinmunidad humana, al demostrar la importancia patogénica de un defecto en la contracción de la respuesta inmune. En tercer lugar, diseccionarán una vía cuya manipulación permitirá la modulación de la duración de la respuesta inmune durante situaciones en las que su prolongación podría ser útil (e.g. vacunación). En cuarto lugar, identificarán moléculas susceptibles de ser blancos terapéuticos y biomarcadores.

6a. Hipótesis

En el apartado de ANTECEDENTES hemos mostrado información preliminar, en su mayoría generada por nosotros, que demuestra que: a) B55beta es una molécula clave para la iniciación de la apoptosis inducida en células T durante la privación de IL-2; b) B55beta induce apoptosis a través de modular la fosforilación de Akt; c) este proceso podría ser anómalo en pacientes con autoinmunidad.

Con base a esos puntos, hemos generado la hipótesis central del proyecto, que establece que **defectos en la terminación de la respuesta inmune causados por fallas en la expresión y/o función de B55beta en células T y células dendríticas contribuyen a la perpetuación de la respuesta inmune y a la etiopatogénesis de la autoinmunidad.**

En este proyecto proponemos una serie de experimentos que nos permitirán evaluar esta hipótesis usando un enfoque amplio, que incluirá el estudio de células humanas de personas sanas y de pacientes con enfermedades autoinmunes. En forma complementaria estudiaremos un modelo murino único, en donde podremos analizar los efectos de la deficiencia de B55beta en diferentes linajes celulares, durante el estado basal así como bajo estimulación antigénica de corta y larga duración.

Consideramos que este proyecto de vanguardia establecerá que B55beta es un regulador clave de la duración de la respuesta inmune y definirá su papel en la patogénesis de enfermedades autoinmunes humanas. Además, este proyecto revelará, por vez primera, el papel del sistema Akt-mTOR en el control de la terminación de la respuesta inmune. Asimismo, contribuirá al conocimiento de un área de la inmunología que ha sido difícil de estudiar por falta de modelos adecuados. También consideramos que los resultados del proyecto abrirán la puerta a la modulación de Akt como una estrategia terapéutica en enfermedades autoinmunes. Dado que existen nuevos fármacos que inhiben Akt, desarrollados para tratar enfermedades oncológicas, los conceptos generados por el proyecto sentarán las bases para el uso de un nuevo tipo de medicamento en pacientes con enfermedades autoinmunes.

6b. Objetivos.

General:

Determinar si existe un defecto en la terminación de la respuesta inmune en pacientes con enfermedades autoinmunes y evaluar la contribución de B55B al mantenimiento de la tolerancia inmunológica.

Específicos:

Analizar el proceso de contracción clonal en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes.

Estudiar la expresión y función de B55beta en células dendríticas

Estudiar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en un modelo in vivo.

7. Metodología: Diseño general.

El presente es un proyecto de investigación biomédica, experimental transversal, abierto. No se realizará ninguna maniobra experimental en pacientes.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1. Analizar el proceso de contracción clonal en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes. Esta parte del proyecto se ha diseñado para investigar si, a nivel de células T, la terminación de la respuesta inmune sucede en forma normal en pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas. Investigaremos la frecuencia con la que se observan defectos de contracción clonal en diferentes enfermedades y si dichos defectos se asocian a inducción deficiente de B55beta.

1.1. Determinar la prevalencia de defectos en apoptosis inducida por privación de IL-2 en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes. Usaremos el superantígeno SEB (enterotoxina B de estafilococo) para estimular a células T de pacientes con enfermedades autoinmunes y controles. La SEB activa a ~20% de las células T [40], lo cual nos permitirá comparar la expansión y contracción de clonas que responden a SEB (identificadas con anticuerpos contra la cadena beta del TCR) y usar como control interno a células que no son activadas por SEB. Se aislarán células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 25 pacientes con LEG, 25 pacientes con AR, 25 pacientes con SS y 25 controles sanos. Este tamaño de muestra se calculó considerando la frecuencia con la que se reportamos defectos en la apoptosis de células T activadas de pacientes con LEG en un estudio previo [33]. La apoptosis se cuantificará por citometría de flujo (anexina V y yoduro de propidio), 24 y 48 horas después del retiro de IL-2.

1.2. Cuantificar la frecuencia de defectos en la inducción de B55beta en células T de pacientes con enfermedades autoinmunes. Usaremos PCR de tiempo real para medir la inducción de B55beta. Para esto, aislaremos RNA del cultivo de CMSP en 3 tiempos: antes de la privación de IL-2, a las 6 horas y a las 24 horas. Se cuantificará el incremento a las 6 y 24 horas en relación al basal.

1.3. Investigar si la inducción defectuosa de B55beta representa un defecto fijo o adquirido. Es posible que la resistencia a la inducción de B55beta y la consecuente resistencia a apoptosis representen un defecto adquirido por clonas de células T que se activan crónicamente o en presencia de mediadores de inflamación. Para distinguir entre estas posibilidades usaremos estrategias complementarias. En primer lugar, activaremos células T de donadores sanos

durante diferentes periodos de tiempo con el fin de evaluar si la activación prolongada resulta en resistencia a la apoptosis. En segundo lugar, las activaremos en presencia de citocinas inflamatorias (e.g. IL-6, TNF-alfa) para determinar si su presencia confiere resistencia a la apoptosis.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2. Estudiar la expresión y función de B55beta en células dendríticas (CDs). Existe muy poca información de cómo se regula la supervivencia de CDs en condiciones de salud y de enfermedad autoinmune. Información generada por nuestro grupo y por otros laboratorios indica que PP2A es una molécula altamente conservada, de expresión ubicua, que regula procesos celulares fundamentales como ciclo celular y apoptosis [25, 33]. En este objetivo, analizaremos la expresión y función de B55beta en CDs y determinaremos si, como en otras células, B55beta regula la inducción de apoptosis. Después, estudiaremos si su expresión y función es normal en pacientes con enfermedades autoinmunes.

2.1. Analizar la expresión y función de B55beta en CDs de individuos sanos. Uno de los factores que regulan la supervivencia de las CDs es la concentración de citocinas que activan la vía de PI3K-Akt-mTOR (e.g. GM-CSF) [41, 42]. B55beta induce apoptosis al inactivar esta vía (Crispín et al., en preparación), por lo tanto es posible que regule la supervivencia de CDs como en células T. Para investigar esto, analizaremos la expresión de B55beta en CDs mieloides aisladas de sangre periférica de individuos sanos. El análisis se realizará con PCR, en células recién aisladas y a las 24 horas de cultivo en presencia y ausencia de GM-CSF. Esto nos permitirá determinar si B55beta se expresa constitutivamente, o si su expresión es inducible en ausencia de citocinas. En forma simultánea, diferenciaremos CDs a partir de monocitos (moCDs) [43] con el fin de determinar si el patrón de expresión de B55beta es similar al que se observa en CDs aisladas de sangre.

2.2. Determinar si la expresión de B55beta es normal en CDs de pacientes con enfermedades autoinmunes. Si los experimentos del apartado 2.1 indican que la expresión y función de B55beta es similar en CDs diferenciadas in vitro y aisladas de sangre, en este apartado trabajaremos con moCDs. Así, diferenciaremos CDs in vitro y estudiaremos si la expresión de B55beta y su cinética de muerte celular (espontánea e inducida a través de Fas) es normal en pacientes con LEG, AR y síndrome de Sjögren.

2.3. Estudiar las consecuencias funcionales de defectos en la expresión de B55beta en CDs. La falla en la expresión de B55beta podría causar la acumulación de CDs activadas con vida anormalmente larga. Usaremos siRNA para silenciar la expresión de B55beta en moCDs de individuos sanos para investigar si la disminución en la expresión de B55beta alarga la vida de las mismas. Asimismo, evaluaremos mediante citometría de flujo la expresión de marcadores de activación y moléculas coestimuladoras (e.g. CD40, CD80, CD86, etc) en CDs transfectadas con siRNA control y específico para B55beta. Por último, analizaremos si el silenciamiento de B55beta aumenta la capacidad de estimular a células T alogénicas.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3. Estudiar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en un modelo in vivo. Hemos generado un ratón con el tercer exón del gen que codifica para B55beta (*Ppp2r2b*) flanqueado por secuencias que reconoce la recombinasa de ADN Cre (**Fig. 5**). Dicho exón es removido por Cre, específicamente en las células en donde se expresa la recombinasa.

Usaremos ratones transgénicos que expresan la recombinasa en tipos celulares específicos para crear líneas murinas que carezcan de la expresión de B55beta en diferentes células. Esto nos permitirá evaluar la función de B55beta en células T y en CD8, durante respuestas inmunes normales y durante el desarrollo de autoinmunidad.

3.1. Analizar las consecuencias de la ausencia de B55beta en células hematopoyéticas. Como estrategia inicial, generaremos una línea de ratones que carezca de B55beta en todas las células hematopoyéticas. Esto se logrará al cruzar el ratón con deficiencia condicional con un ratón que expresa Cre asociado al promotor de Vav [44]. Esta estrategia nos permitirá evaluar las funciones del gen en forma global, en todas las células del sistema inmune.

3.1.1. Determinar si la ausencia de B55beta causa enfermedad autoinmune. Con el fin de determinar si la ausencia de B55beta causa autoinmunidad, vigilaremos a 3 cohortes de ratones de la cepa C57BL/6 durante un año: a) B55beta presente; b) deficiencia heterocigota; c) deficiencia homocigota. Cada mes buscaremos proteinuria, presencia de anticuerpos antinucleares, y mediremos la frecuencia de células T activadas (CD44⁺ CD62L⁻) en sangre periférica. Si los ratones no desarrollan enfermedad en forma espontánea, serán sacrificados al año de edad y sus órganos serán analizados en busca de signos de inflamación. Si los ratones se enferman antes, serán sacrificados y analizados en diferentes momentos.

3.1.2. Estudiar si la ausencia de B55beta altera la contracción de células T. Como experimento inicial, inyectaremos SEB a los ratones. Esto causa la expansión de algunas clonas de células T. Mediremos la frecuencia de las células T CD4 y CD8 que responden a SEB (Vbeta8) a lo largo de 2 semanas para observar su expansión y contracción. Compararemos esta cinética en ratones con y sin B55beta. Para el siguiente experimento, cruzaremos a los ratones deficientes en B55beta con ratones OT-I y OT-II (que expresan un receptor de células T específico para péptidos derivados de ovoalbúmina presentados por moléculas de clase I y II, respectivamente). Infectaremos a estos ratones con una cepa de *Listeria monocytogenes* que expresa ovoalbúmina y estudiaremos la expansión y contracción de las clonas de células T CD8 y CD4, respectivamente [45].

3.2. Analizar los efectos de la deficiencia selectiva de B55beta en células T. Con el fin de diseccionar cuál es la función de B55beta en células T y para identificar las consecuencias de la falla en la terminación de la respuesta inmune en células T, cruzaremos el ratón con deficiencia condicional de B55beta con un ratón que expresa Cre bajo el promotor de CD4 [46]. Estudiaremos: a) si la activación, proliferación, y diferenciación funcional de las células T es normal; b) si la deficiencia selectiva de B55beta en células T causa enfermedad autoinmune; c) la cinética de expansión y contracción clonal durante infección por *L. monocytogenes*.

3.3. Evaluar las consecuencias de la deficiencia de B55beta en CD8 mieloides. En forma análoga a los experimentos del objetivo 3.2, cruzaremos el ratón deficiente de B55beta con un ratón CD11c-Cre [47] y evaluaremos el desarrollo de autoinmunidad y la cinética de expansión y contracción clonal durante infección sistémica. Además evaluaremos si el número y el fenotipo de las CD8 es normal.

3.4. Analizar la expresión de B55beta durante respuestas inmunes agudas y crónicas. Usaremos el ratón reportero en donde las células que expresan B55beta expresarán LacZ. Infectaremos a los ratones reporteros con dos cepas del virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) que causan

una infección aguda (Armstrong) y crónica (clona 13) [48]. Durante la infección aguda, analizaremos por citometría de flujo e inmunohistoquímica (REF) la expresión de B55beta (LacZ) en el bazo los días 0 (antes de la infección), 2, 5, 7, 14 y 21. La citometría de flujo permitirá identificar con mayor facilidad qué células expresan B55beta. La inmunohistoquímica revelará en qué estructuras anatómicas (e.g. centros germinales) se expresa. Durante la infección con la cepa LCMV clona 13 que causa infección crónica, analizaremos la expresión antes de la infección y a las semanas 1, 2, 4, 8, 12 y 24.

El número de pacientes que se estudiará se calculó en base a un trabajo previo en donde analizamos la expresión de B55beta en células T de pacientes con LEG [33]. En dicho trabajo mostramos que la expresión de B55beta, inducida por 48 horas de privación de IL-2, es un fenómeno poco variable en individuos sanos y pacientes con LEG (la desviación estándar fue de 0.8 y 1.1, respectivamente). En base a las diferencias entre pacientes y controles y en base a la poca variabilidad en cada grupo, hemos calculado que una muestra de 25 pacientes y 25 controles nos permitirán realizar el estudio, asumiendo un error alfa de 0.05 y un poder de 0.90.

Los pacientes serán reclutados de la consulta externa de reumatología y de los servicios de hospitalización del INCMNSZ. Los pacientes que elijan participar firmarán un consentimiento informado. Como controles sanos se considerarán individuos de la misma edad (± 5 años) y sexo que los pacientes. Se invitará a participar como controles a familiares de los pacientes. Los individuos que participen como controles también firmarán consentimiento informado.

8. Metodología: Criterios de selección

Pacientes: Pacientes con LEG, AR, o síndrome de Sjögren primario que cumplan con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR) serán reclutados en forma consecutiva. Se incluirá a todos los pacientes sin importar su tratamiento. Se incluirá a pacientes con enfermedad activa e inactiva, sin importar el tipo de manifestaciones clínicas que tengan o hayan tenido.

Controles: Personas sanas, pareadas por sexo y edad (± 5 años) serán reclutadas como controles.

Todos los pacientes y controles serán adultos y firmarán formas de consentimiento informado, y estarán libres de infecciones actuales.

9. Metodología: Desenlaces y variables

Objetivos específicos 1 y 2.

Apoptosis. Se cuantificará el porcentaje de células apoptóticas en cultivos de células T por medio de citometría de flujo. Se considerarán apoptóticas a las células que unen Anexina V sin ser permeables a yoduro de propidio.

Inducción de B55beta. Se medirá por medio de PCR cuantitativo. Se compararán los niveles antes y después de someter a las células a privación de IL-2. Los niveles de GAPDH se usarán como control.

Objetivo específico 3.

Apoptosis e inducción de B55beta. Se medirán de la misma manera que en células humanas.

Proteinuria. Se cuantificará albúmina por medio de ELISA en muestras de orina. Se normalizará el resultado contra la creatinina urinaria.

Anticuerpos antinucleares. Se medirán por medio de inmunofluorescencia indirecta en células HEp-2.

Fenotipificación de células T y dendríticas. Se medirá la expresión de diversas moléculas por medio de citometría de flujo. Los resultados se expresarán como porcentaje de células positivas.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

Ninguno

BENEFICIOS INDIRECTOS:

Todo lo que deriva de entender mejor la enfermedad de un paciente: mejores modelos conceptuales, mejor diseño de terapias, identificación de biomarcadores y blancos terapéuticos, etc.

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : Aquellas derivadas de la venopunción

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : Equímosis en el sitio de venopunción

EFFECTOS ADVERSOS : No aplica

EFFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguno

METODOS DE SEGURIDAD : No aplica

PROCEDIMIENTOS : No aplica

OTRO TIPO DE RIESGO : No aplica

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.

- 1 Mallick, C. A., Dudley, E. C., Viney, J. L., Owen, M. J. and Hayday, A. C., Rearrangement and diversity of T cell receptor beta chain genes in thymocytes: a critical role for the beta chain in development. *Cell* 1993. 73: 513-519.
- 2 Alanio, C., Lemaître, F., Law, H. K., Hasan, M. and Albert, M. L., Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* 2010. 115: 3718-3725.
- 3 Blattman, J. N., Antia, R., Sourdive, D. J., Wang, X., Kaech, S. M., Murali-Krishna, K., Altman, J. D. and Ahmed, R., Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J.Exp.Med.* 2002. 195: 657-664.
- 4 Masopust, D., Murali-Krishna, K. and Ahmed, R., Quantitating the magnitude of the lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8 T-cell response: it is even bigger than we thought. *J.Virol.* 2007. 81: 2002-2011.
- 5 Hedrick, S. M., Ch'en, I. L. and Alves, B. N., Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. *Immunol Rev.* 2010. 236: 41-53.
- 6 Marrack, P., Scott-Brownie, J. and Macleod, M. K., Terminating the immune response. *Immunol Rev.* 2010. 236: 5-10.
- 7 Strasser, A., The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat.Rev.Immunol* 2005. 5: 189-200.
- 8 Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J. and Marrack, P., Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity.* 2002. 16: 759-767.
- 9 Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P. and Strasser, A., Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003. 100: 14175-14180.
- 10 Wojciechowski, S., Jordan, M. B., Zhu, Y., White, J., Zajac, A. J. and Hildeman, D. A., Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. *Eur.J.Immunol* 2006. 36: 1694-1706.
- 11 Bauer, A., Villunger, A., Labi, V., Fischer, S. F., Strasser, A., Wagner, H., Schmid, R. M. and Hacker, G., The NF-kappaB regulator Bcl-3 and the BH3-only proteins Bim and Puma control the death of activated T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006. 103: 10979-10984.
- 12 Fischer, S. F., Belz, G. T. and Strasser, A., BH3-only protein Puma contributes to death of antigen-specific T cells during shutdown of an immune response to acute viral infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008. 105: 3035-3040.
- 13 Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D. L., Bath, M. L., Adams, J. M., Cory, S. and Harris, A. W., Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991. 88: 8661-8665.
- 14 Hutcheson, J., Scatizzi, J. C., Siddiqui, A. M., Haines, G. K., III, Wu, T., Li, Q. Z., Davis, L. S., Mohan, C. and Perlman, H., Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity.* 2008. 28: 206-217.
- 15 Lenardo, M., Chan, K. M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J. and Zheng, L., Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu.Rev.Immunol* 1999. 17: 221-253.
- 16 Hung, C. M., Garcia-Haro, L., Sparks, C. A. and Guertin, D. A., mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* 2012. 4.
- 17 Laplante, M. and Sabatini, D. M., mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012. 149: 274-293.
- 18 Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E., Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999. 13: 2905-2927.
- 19 Delgoffe, G. M., Kole, T. P., Zheng, Y., Zarek, P. E., Matthews, K. L., Xiao, B., Worley, P. F., Kozma, S. C. and Powell, J. D., The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity.* 2009. 30: 832-844.
- 20 Procaccini, C., De, R., V. Galgani, M., Abanni, L., Cali, G., Porcellini, A., Carbone, F., Fontana, S., Horvath, T. L., La, C. A. and Matarese, G., An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness. *Immunity.* 2010. 33: 929-941.
- 21 Lee, K., Gudapati, P., Dragovic, S., Spencer, C., Joyce, S., Killeen, N., Magnuson, M. A. and Boothby, M., Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity.* 2010. 32: 743-753.
- 22 Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S. and Koyasu, S., PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of RORgamma. *Cell Rep.* 2012. 1: 360-373.
- 23 Chi, H., Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat.Rev.Immunol* 2012. 12: 325-338.

- 24 Shi, Y., Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 2009. 139: 468-484.
- 25 Janssens, V., Longin, S. and Goris, J., PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem.Sci.* 2008. 33: 113-121.
- 26 Katsiari, C. G., Kyttaris, V. C., Juang, Y. T. and Tsokos, G. C., Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 2005. 115: 3193-3204.
- 27 Apostolidis, S. A., Rauen, T., Hedrich, C. M., Tsokos, G. C. and Crispin, J. C., Protein phosphatase 2A enables expression of interleukin 17 (IL-17) through chromatin remodeling. *J Biol Chem* 2013. 288: 26775-26784.
- 28 Crispin, J. C., Apostolidis, S. A., Rosetti, F., Keszei, M., Wang, N., Terhorst, C., Mayadas, T. N. and Tsokos, G. C., Cutting edge: protein phosphatase 2A confers susceptibility to autoimmune disease through an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 2012. 188: 3567-3571.
- 29 Chang, J., Voorhees, T. J., Liu, Y., Zhao, Y., and Chang, C. H., Interleukin-23 production in dendritic cells is negatively regulated by protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010. 107: 8340-8345.
- 30 Endong, L., Shijie, J., Sonobe, Y., Di, M., Hua, L., Kawanokuchi, J., Mizuno, T. and Suzumura, A., The gap-junction inhibitor carbenoxolone suppresses the differentiation of Th17 cells through inhibition of IL-23 expression in antigen presenting cells. *J Neuroimmunol* 2011. 240-241: 58-64.
- 31 Hay, N. and Sonenberg, N., Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004. 18: 1926-1945.
- 32 Hart, J. R. and Vogt, P. K., Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget.* 2011. 2: 467-476.
- 33 Crispin, J. C., Apostolidis, S. A., Finnell, M. I. and Tsokos, G. C., Induction of PP2A Bbeta, a regulator of IL-2 deprivation-induced T-cell apoptosis, is deficient in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011. 108: 12443-12448.
- 34 Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, M. and Mantovani, A., Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J.Biol.Chem.* 1992. 267: 18278-18283.
- 35 Weller, M., Malipiero, U., Groscurth, P. and Fontana, A., T cell apoptosis induced by interleukin-2 deprivation or transforming growth factor-beta 2: modulation by the phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A. *Exp.Cell Res.* 1995. 221: 395-403.
- 36 Kovacs, B., Vassilopoulos, D., Vogelgesang, S. A. and Tsokos, G. C., Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol* 1996. 81: 293-302.
- 37 Xu, L., Zhang, L., Yi, Y., Kang, H. K. and Datta, S. K., Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med* 2004. 10: 411-415.
- 38 Gergely, P., Jr., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., Banki, K., Phillips, P. E. and Perl, A., Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002. 46: 175-190.
- 39 Chen, M., Wang, Y. H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y. J. and Wang, J., Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 2006. 311: 1160-1164.
- 40 Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E. W., Bigler, R. D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D. N., Choi, Y. and Marrack, P., V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989. 244: 811-813.
- 41 Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R. and Ricciardi-Castagnoli, P., Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 1998. 188: 2175-2180.
- 42 Woltman, A. M., van der Kooij, S. W., Coffey, P. J., Offringa, R., Daha, M. R. and van Kooten, C., Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood* 2003. 101: 1439-1445.
- 43 Crispin, J. C., Vargas-Rojas, M. I., Monsivais-Urenda, A. and Alcocer-Varela, J., Phenotype and function of dendritic cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2012. 143: 45-50.
- 44 Georgiades, P., Ogilvy, S., Duval, H., Licence, D. R., Charnock-Jones, D. S., Smith, S. K. and Print, C. G., VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. *Genesis* 2002. 34: 251-256.
- 45 Rodriguez-Rodriguez, N., Apostolidis, S. A., Penaloza-MacMaster, P., Martin Villa, J. M., Barouch, D. H., Tsokos, G. C. and Crispin, J. C., Programmed Cell Death 1 and Helios Distinguish TCR-alpha-beta+ Double-Negative (CD4-CD8-) T Cells That Derive from Self-Reactive CD8 T Cells. *J Immunol* 2015.
- 46 Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, A., Jaenisch, R. and

Wilson, C. B., A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 2001. 15: 763-774.

47 Vander Lugt, B., Khan, A. A., Hackney, J. A., Agrawal, S., Lesch, J., Zhou, M., Lee, W. P., Park, S., Xu, M., DeVoss, J., Spooner, C. J., Chalouni, C., Delamarre, L., Mellman, I. and Singh, H., Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation. *Nat Immunol* 2014. 15: 161-167.

48 Althaus, C. L., Ganusov, V. V. and De Boer, R. J., Dynamics of CD8+ T cell responses during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 2007. 179: 2944-2951.

49 McKinney, E. F., Lee, J. C., Jayne, D. R., Lyons, P. A. and Smith, K. G., T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature* 2015. 523: 612-616.

- 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.**