Fosforilación de STAT3 incrementada en células B de pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable

AUTORES: VELÁSQUEZ-ORTIZ MG.[1], OLGUÍN-CALDERÓN D[3], HUERTA-ROBLES HMR[2], SEGURA-MENDEZ NH[4], O'FARRIL-ROMANILLOS P[4], SCHEFFER-MENDOZA S[5], YAMAZAKI-NAKASHIMADA MA[5], GARCÍA-CRUZ ML[6], STAINES-BOONE T[7], SANTOS-ARGUMEDO L[3], BERRON-RUIZ L[2]

[1] Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, Ciudad Universitaria, México.
[2] Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias, Instituto Nacional de Pediatría SSA, México.
[3] Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV IPN, México.
[4] Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo XXI, IMSS, México.
[5] Servicio de Inmunología uy Alergia, Instituto Nacional de Pediatría SSA, México.
[6] Departamento de Otorrinolaringología, INER, México.
[7] Servicio de Alta Especialidad, Centro Médico Noreste IMSS, México.

Introducción

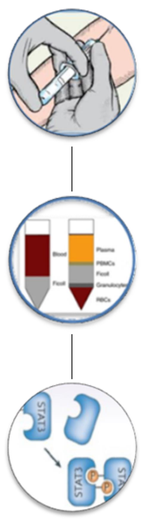
La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) es el síndrome sintomático más común entre los Errores Innatos de la Inmunidad, está caracterizada por presentar niveles reducidos de IgG e IgA en suero y la mitad de los pacientes también presentan bajos niveles de IgM. A pesar de poseer células B en sangre periférica, los pacientes frecuentemente tienen problemas en la diferenciación de células B hacia células plasmáticas. Se sabe que el inductor más potente de la diferenciación terminal hacia células plasmáticas en centro germinal es la IL-21, recientemente se han encontrado mutaciones de ganancia de función en STAT3 las cuales se han identificado en pacientes con IDCV, por lo que se considera que los pacientes podrían tener defectos funcionales en la vía de señalización IL-21/STAT3 lo que se podría reflejar en la producción de anticuerpos.

Objetivo

Determinar los defectos en la vía de señalización IL-21/STAT3 en células B de pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable, por medio del análisis de la fosforilación de la proteína STAT3 (pSTAT3).

Materiales y métodos

Se determino la pSTAT3 en 23 pacientes con IDCV y 14 testigos



Obtención de sangre periférica

Purificación de PBMC's

Determinación de la fosforilación de STAT3

Las células se activaron in vitro en las siguientes condiciones:
- Sin estímulo
- IL-21r
  - 15 minutos
  - 60 minutos

Transcurrido el tiempo se detuvo la activación y se realizó la tinción intracelular de pSTAT3, a continuación se muestra la estrategia de análisis empleada

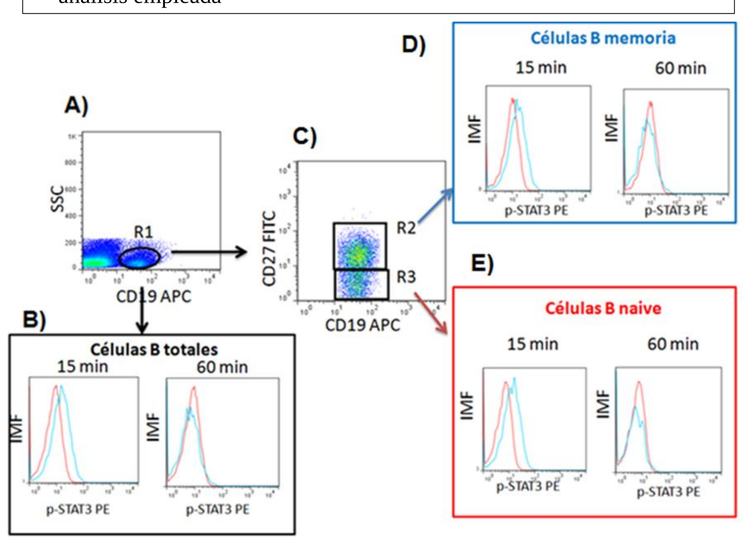


Figura 1. Estrategia de análisis de la determinación de pSTAT3 en células B totales (B), de memoria (D) y naive (E), así como las poblaciones de las cuales se parte para tener los resultados (A,C).

Resultados

A) El comportamiento normal de pSTAT3, es un aumento de fosforilación a los 15 minutos y un retorno a su estado basal a los 60 minutos, como se muestra en la figura 2 .

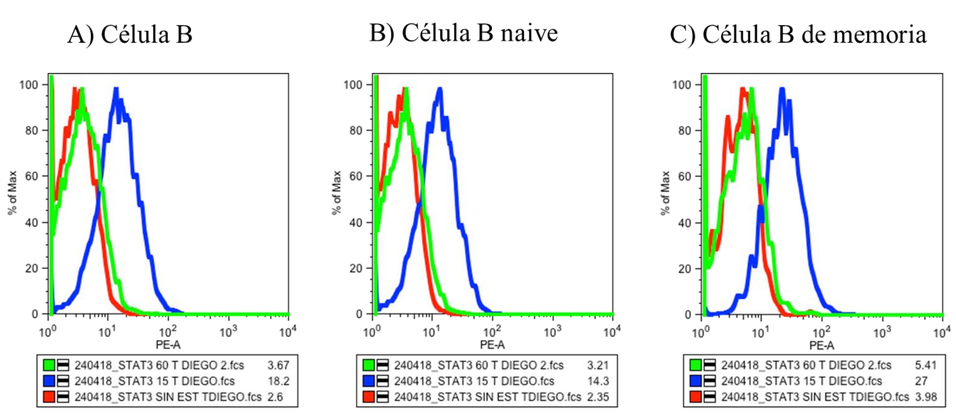


Figura 2. Fosforilación de la proteína STAT3 en un donador sano, en el histograma rojo se observa la condición sin estímulo que se encuentra en estado basal, en el histograma azul se observa la condición a los 15 minutos donde la proteína está fosforilada, en el histograma verde se observa que a los 60 minutos la proteína se encuentra desfosforilada, esto ocurre en células B totales (A), naive (B) y de memoria (C)

B) Los pacientes con IDCV tienen un aumento significativo comparado con los donadores sanos, en pSTAT3 a los 60 minutos en las células B totales, naive y de memoria de los pacientes , tal como se observa en la figura 3.

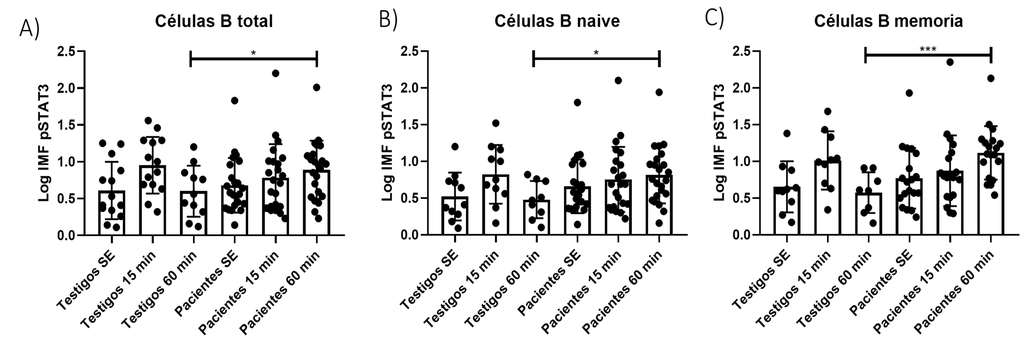


Figura 3. Resultados de la fosforilación de STAT3, se muestra la comparación de la IMF entre pacientes (n=23) y testigos (n=14) en las diferentes condiciones y tiempos. A) Células B totales (p=0.0440). B) Células B naive (p=0.0230). C) Células B de memoria (p=0.0010). Prueba ANOVA p<0.05.

C) Se clasificó a los pacientes en el grupo 1 cuando su porcentaje de células B de memoria se encontraba disminuido y grupo 2 cuando se encontraba normal. Los pacientes del grupo 1 tuvieron un aumento significativamente mayor, de pSTAT3, que el grupo 2 en las células B de memoria a los 60 minutos (figura 4).

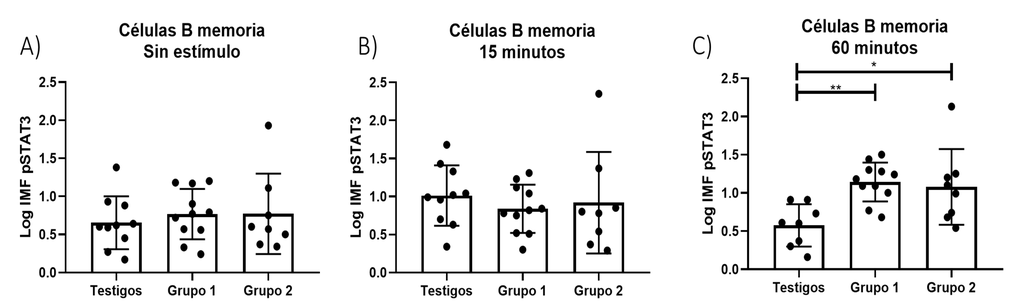


Figura 4. Resultados de la fosforilación de STAT3 en células B de memoria. Se muestra la comparación de la IMF entre pacientes de los distintos grupos y testigos a los diferentes tiempos. A) Sin estímulo. B) 15 minutos. C) 60 minutos (p=0.0070 y p=0.0260). Prueba ANOVA p<0.05

D) Al comparar la pSTAT3 sin estimulo, a los 15 y 60 minutos de manera individual (testigos, grupo 1 y 2) se observó que los pacientes del grupo 1 tienen un aumento significativo de pSTAT3 en las células B de memoria a los 60 minutos, mientras que en los testigos tienen una disminución de pSTAT3 a dicho tiempo (figura 5).

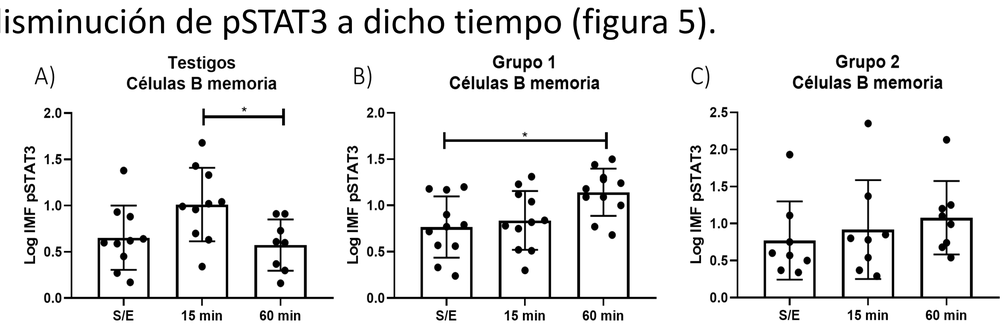


Figura 5. Resultados de la fosforilación de STAT3 en células B de memoria. Se muestra la comparación de la IMF entre los distintos tiempos en cada grupo de pacientes, así como en los testigos. A) Testigos (p=0.0450). B) Grupo 1 (p=0.0230). C) Grupo 2. Prueba ANOVA p<0.05

Conclusiones

- En los pacientes, la pSTAT3, muestran un comportamiento diferente respecto a los testigos, tanto en células B totales, naive y de memoria a los 60 minutos.
- Este comportamiento anormal de pSTAT3 es más significativo en los pacientes del grupo 1. Ya que este grupo presenta un aumento significativo de pSTAT3 a los 60 minutos con respecto a la condición no estimulada.
- La fosforilación anormal de STAT3 que presentan los pacientes con IDCV en sus células B, podría explicar su fenotipo clínico, y muestra una evidente falla en la activación de la vía de señalización IL-21/STAT3, es por lo que es necesario que se profundice mas en esta vía.

Este trabajo fue realizado con apoyo de Fondos Federales INP 027-2016 y Proyecto de Ciencia Básica de CONACyT 256471