

# Los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 están asociados a circuitos inflamatorios aberrantes en pacientes con enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas

Luis M. Amezcua-Guerra,<sup>1\*</sup> Luis F. Pérez-García,<sup>2</sup> Valentín Jiménez-Rojas,<sup>1</sup> Ricardo Márquez-Velasco<sup>1</sup> y Luis H. Silveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Ciudad de México, México; <sup>2</sup>Departamento de Reumatología, Erasmus Medical Center, University Medical Center, Róterdam, Países Bajos; <sup>3</sup>Departamento de Reumatología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Ciudad de México, México

## Resumen

**Introducción:** Los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 son marcadores de varias enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas (ERAS). **Objetivo:** Evaluar si los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 están relacionados con anomalías en los circuitos inflamatorios. **Métodos:** Estudio transversal de pacientes consecutivos y ambulatorios con ERAS. Los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y la proteína amiloide sérica se midieron mediante ELISA; los paneles para 18 citocinas y nueve quimiocinas se analizaron en una plataforma de lectura Luminex; la proteína C reactiva (hs-CRP) y el complemento se midieron mediante nefelometría. **Resultados:** Se incluyeron 167 pacientes, 143 con lupus eritematoso sistémico (LES), 16 con síndrome de Sjögren primario y ocho con esclerosis sistémica; 41 fueron positivos para anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 (24 %). Los pacientes con anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 tuvieron niveles séricos más altos de IL-2, IL-4, IL-6, GM-CSF, IL-21, IL-22, hs-CRP y quimiocinas CCL4, CXCL8, CXCL10 y CXCL12; y más bajos de complemento C4. Los títulos de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 correlacionaron positivamente con IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IL-22, CXCL10 y hs-CRP; y negativamente con complemento C3 y C4. Al incluir solo LES, no se identificó asociación entre los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y la actividad de la enfermedad o la afectación específica de órganos. **Conclusiones:** Los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 se asocian a circuitos aberrantes de citocinas y niveles elevados de moléculas angiogénicas y quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos, lo que sugiere un papel activo de esos anticuerpos en las ERAS.

**PALABRAS CLAVE:** Anticuerpos anti-Ro52/TRIM21. Citocinas. Inflamación. Quimiocinas.

## Anti-Ro52/TRIM21 antibodies are associated with aberrant inflammatory circuits in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases

### Abstract

**Introduction:** Anti-Ro52/TRIM21 antibodies are markers for several systemic autoimmune rheumatic diseases (SARD). **Objective:** To assess whether anti-Ro52/TRIM21 antibodies are related to abnormalities in inflammatory circuits. **Methods:** Cross-sectional study of consecutive outpatients with SARD. Anti-Ro52/TRIM21 antibodies and serum amyloid A protein were measured by ELISA; panels for 18 cytokines and nine chemokines were analyzed on a Luminex reading platform, while high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and complement were measured by nephelometry. **Results:** Among 167

#### \*Correspondencia:

Luis M. Amezcua-Guerra  
E-mail: [lmamezcua@gmail.com](mailto:lmamezcua@gmail.com)

Fecha de recepción: 08-09-2022

Fecha de aceptación: 20-09-2022

DOI: 10.24875/GMM.22000299

Gac Med Mex. 2023;159:56-65

Disponible en PubMed

[www.gacetamedicademexico.com](http://www.gacetamedicademexico.com)

0016-3813/© 2022 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

included patients, 143 had systemic lupus erythematosus (SLE), 16 had primary Sjögren's syndrome and eight had systemic sclerosis; 41 (24%) were positive for anti-Ro52/TRIM21 antibodies. Patients with anti-Ro52/TRIM21 antibodies had higher serum levels of IL-2, IL-4, IL-6, GM-CSF, IL-21, IL-22, hs-CRP and chemokines CCL4, CXCL8, CXCL10 and CXCL12, but lower levels of complement C4. Anti-Ro52/TRIM21 antibody titers were positively correlated with IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IL-22, CXCL10, and hs-CRP, and negatively with complement C3 and C4. When only SLE patients were included, no association was identified between anti-Ro52/TRIM21 antibodies and disease activity or organ-specific involvement. **Conclusions:** Anti-Ro52/TRIM21 antibodies are associated with aberrant cytokine circuits and elevated levels of angiogenic molecules and neutrophil and monocyte chemoattractants, which suggests an active role for these antibodies in SARD.

**KEYWORDS:** Anti-Ro52/TRIM21 antibodies. Cytokines. Inflammation. Chemokines.

## Introducción

Las enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas (ERAS) son trastornos complejos en los que factores como la luz ultravioleta, las infecciones, las hormonas y los adyuvantes actúan como desencadenantes para iniciar mecanismos inmunitarios aberrantes en individuos genéticamente susceptibles.<sup>1</sup> Las ERAS se caracterizan por la pérdida de los puntos de control inmunitario y la activación descontrolada de células efectoras. Este funcionamiento inmunitario aberrante se traduce en anomalías en los circuitos de citocinas y en la producción de autoanticuerpos, que forman el sustrato fisiopatológico del daño tisular y orgánico que define a dichas enfermedades.<sup>1</sup>

La molécula TRIM21 es una proteína de 52 kDa (Ro52) reconocida por los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21, marcadores serológicos encontrados frecuentemente en pacientes con ERAS.<sup>2</sup> Como miembro de la familia de proteínas con motivo tripartito, TRIM21 se compone de un dominio RING, una secuencia de caja B de tipo 2 y una región helicoidal. TRIM21 es la enzima ubiquitina ligasa E3, que participa en las modificaciones postraduccionales que conducen a la proteólisis en el proteasoma.<sup>3</sup> Después de su activación por una enzima activadora (E1), la ubiquitina se transfiere a una enzima de conjugación (E2), desde donde se transfiere a la proteína diana por la ligasa E3. Este proceso da como resultado la poliubiquitinación de la proteína diana, con la consiguiente captura y degradación por parte del proteasoma (Figura 1).<sup>4</sup> TRIM21 media la ubiquitinación de múltiples proteínas, incluidos los factores reguladores de interferón (IRF) y el factor nuclear kappa B (NF-κB).<sup>3,5</sup> Por lo tanto, TRIM21 es un potente regulador de la producción de citocinas y su interrupción funcional conduce a mayor producción de interleucinas e interferones.<sup>4,6,7</sup>

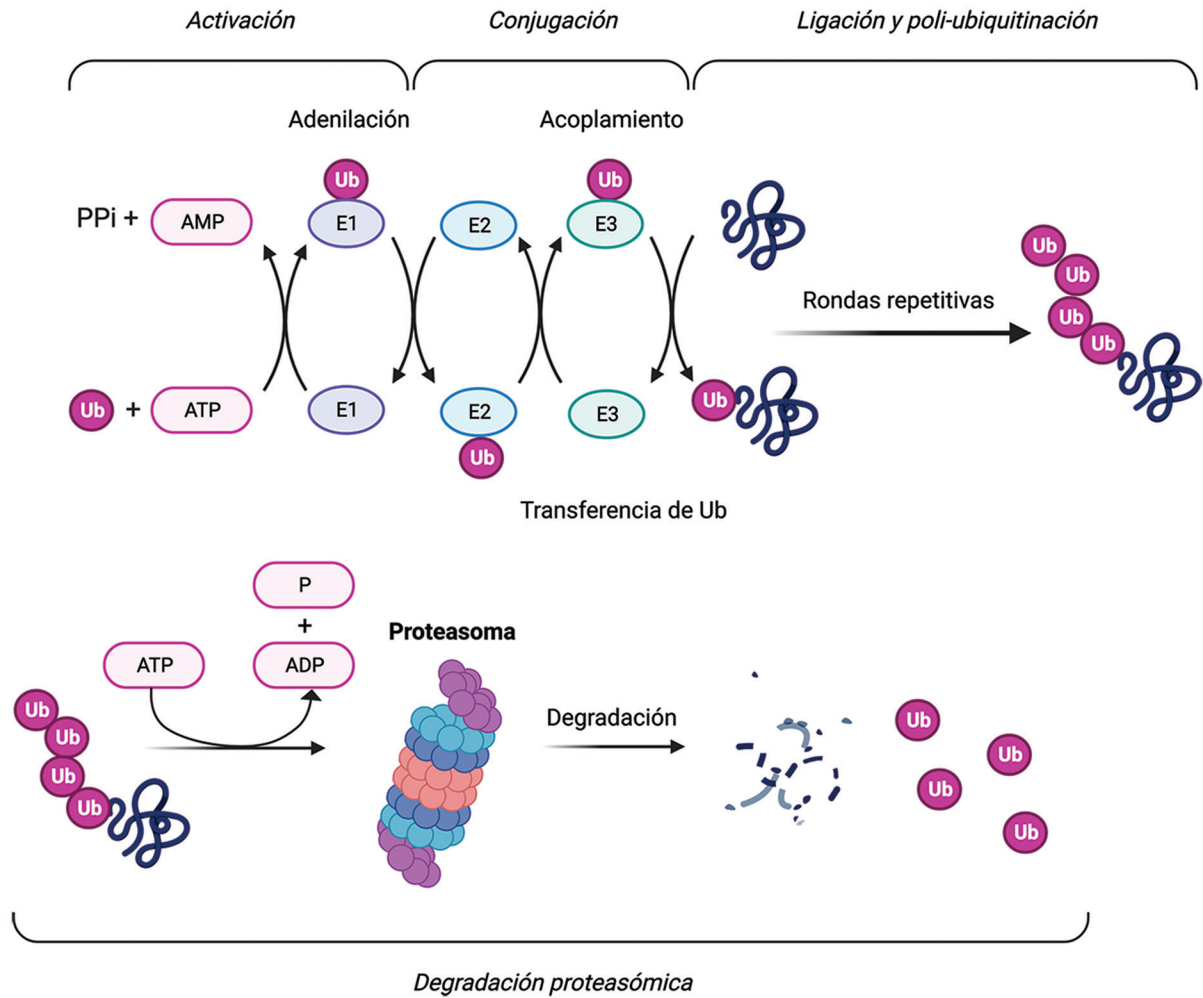
Se ha demostrado la interacción de los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 con su blanco antigénico dentro de células vivas (líneas celulares e hibridomas).<sup>2,8</sup> Esta interacción conduce a la pérdida de la función reguladora de TRIM21, con el consiguiente aumento de la producción de inmunoglobulinas y mediadores inflamatorios solubles.<sup>7</sup> Sin embargo, aún no se han identificado los circuitos de citocinas predominantemente afectados por la presencia de anticuerpos circulantes anti-Ro52/TRIM21 en pacientes con ERAS, ni si estos anticuerpos pueden influir en los niveles séricos de otras moléculas inflamatorias como las quimiocinas y las pentraxinas.

## Métodos

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", un hospital de tercer nivel dedicado a la docencia universitaria. Se incluyeron pacientes adultos con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES),<sup>9</sup> síndrome de Sjögren primario (SSp)<sup>10</sup> o esclerosis sistémica (ES).<sup>11</sup> Se excluyeron pacientes con superposición autoinmune y conectivopatía indiferenciada o enfermedad mixta del tejido conectivo, aunque se permitió la superposición con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. Ningún paciente tenía una infección clínicamente aparente. No se incluyeron mujeres embarazadas o puérperas e individuos con antecedente de neoplasia, insuficiencia renal crónica o infección por virus de la hepatitis B o C, o virus de la inmunodeficiencia humana.

El estudio siguió las directrices de la Declaración de Helsinki y el protocolo (No. 16-960) fue aprobado por los comités de investigación y ética del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Los pacientes firmaron el consentimiento informado y autorizaron el uso de datos clínicos y muestras biológicas con fines de investigación.

En el reclutamiento, los pacientes fueron examinados por el mismo reumatólogo y se evaluaron estudios



**Figura 1.** Sistema de ubiquitinación de proteínas para la degradación proteosómica. Primero, la enzima activadora E1 activa a la ubiquitina usando ATP y la transfiere a la enzima conjugadora E2. Por su parte, la enzima ligasa E3 reconoce un sustrato proteico y recluta a la enzima E2 para catalizar la transferencia de ubiquitina desde E2 al sustrato proteico. Después de repetidas rondas de ligación y ubiquitinación, el sustrato proteico poliubiquitinado se transfiere a un complejo de proteasa dependiente de ATP, llamado proteasoma, que degrada a las proteínas dañadas o mal plegadas en polipéptidos más pequeños. Creado con BioRender.com.

radiográficos y de laboratorio. En pacientes con LES, la actividad de la enfermedad se determinó mediante el índice SLEDAI-2K.<sup>12</sup> La afectación específica de órganos se evaluó conforme a las definiciones preestablecidas.<sup>13</sup>

Los sueros se obtuvieron de sangre venosa por centrifugación (600 g, 15 minutos, 4 °C) y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Cada alícuota se descongeló en condiciones estándar para medir los diferentes mediadores en procesos independientes. Los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 (Orgentec Diagnostika, Alemania; corte para positividad en 25 U/mL) y la proteína amiloide A sérica (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos; rango 9.4-600 ng/mL) se cuantificaron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Las citocinas se

midieron con un panel 18-Plex Human ProcartaPlex y las quimiocinas con un panel 9-Plex Human ProcartaPlex (ThermoFisher) en una plataforma de lectura Luminex (MagPix, Luminex Corp., Estados Unidos). La proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) y las proteínas del complemento C3 y C4 se midieron mediante nefelometría (Beckman Coulter, Estados Unidos).

La distribución de datos se evaluó mediante la prueba de D'Agostino-Pearson. De acuerdo con la distribución observada, las medianas (y los valores mínimos y máximos) se utilizaron como descriptores para las variables continuas; para las discretas se utilizaron proporciones y porcentajes. Las diferencias entre grupos (muestras independientes) se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney; las diferencias entre

**Tabla 1. Principales datos clínicos y de laboratorio de pacientes con enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas**

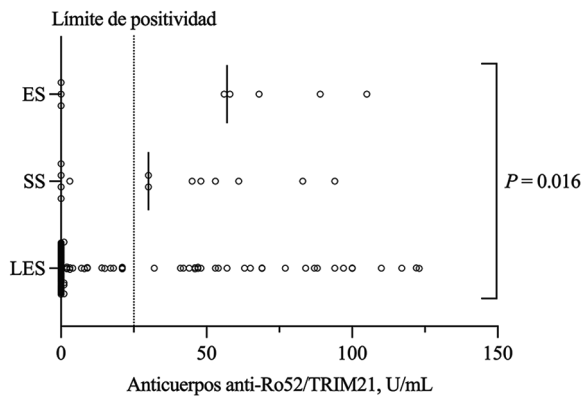
Datos clínicos y de laboratorio	Total (n = 167)		Anticuerpos anti-Ro52/TRIM21				p
	Mediana	Mín-máx.	Positivos (n = 41)		Negativos (n = 126)		
			Mediana	Mín-máx.	Mediana	Mín-máx.	
Edad en años	41	18-81	45	19-79	39	18-81	0.100
Años de evolución	6	3-12	4	1-18	6	1-41	0.028
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	24.7	15.2-40.4	24.9	17.9-40.4	24.4	15.2-37.3	0.816
Estudios de laboratorio							
Leucocitos (× 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.7	2.6-14.8	4.9	2.6-14.8	5.8	2.7-13.0	0.090
Neutrófilos (× 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3.3	1.3-13.3	2.7	1.3-13.3	3.3	1.3-9.8	0.201
Plaquetas (× 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	227	32-595	227	87-595	226	32-400	0.878
Hemoglobina (g/dL)	13.6	6.0-20.3	13.5	7.6-20.3	13.7	6.0-19.1	0.324
Creatinina (mg/dL)	0.7	0.3-13.9	0.7	0.3-6.9	0.7	0.3-13.9	0.564
Nitrógeno ureico (mg/dL)	14.3	4.8-81.9	12.9	4.8-75.8	14.5	6.6-81.9	0.423
VSG (mm/h)	10	1-140	14	4-119	10	1-140	0.166
Complemento C3 (mg/L)	94.4	11.9-150.1	92.7	11.9-135.9	94.9	23.1-150.1	0.062
Complemento C4 (mg/L)	15.7	1.5-43.8	13.4	1.7-29.0	17.0	1.5-43.8	0.003
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
Sexo femenino	149	89	38	92	111	88	0.566
Enfermedad autoinmune							
Lupus eritematoso sistémico	143	85	28	68	115	91	0.001
Síndrome de Sjögren primario	16	9	8	19	8	6	
Esclerosis sistémica	8	4	5	12	3	2	
Hipertensión arterial sistémica	59	35	13	31	46	36	0.707
Diabetes	12	7	2	4	10	7	0.732
SAF	31	18	4	9	27	21	0.109
Tratamiento							
Glucocorticoides	80	119	18	43	62	49	0.592
Hidroxicloroquina	121	72	23	56	98	77	0.009
Ciclofosfamida	42	25	9	21	33	26	0.681
Micofenolato de mofetilo	47	28	14	34	33	26	0.325
Azatioprina	37	22	5	12	32	25	0.086
Metotrexato	35	20	10	24	25	19	0.516
Anticuerpos							
Anticuerpos antinucleares	167	100	41	100	126	100	1.0
Anti-dsDNA	112	67	28	68	84	66	1.0
Anti-Ro/SS-A	70	41	41	100	29	23	< 0.0001
Anti-La/SS-B	28	16	17	41	11	8	< 0.0001
Anti-Sm	23	13	6	14	17	13	0.800
Anti-RNP	55	32	11	26	44	34	0.444
Antinucleosomas	80	47	19	46	61	48	0.858

SAF: síndrome de anticuerpos antifosfolípidos; VSG: velocidad de sedimentación globular.

más de dos grupos se evaluaron con la prueba de Kruskal-Wallis (posprueba de Dunn). Las diferencias entre proporciones se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher o la prueba de chi cuadrada, según correspondiera. Las asociaciones se analizaron mediante el coeficiente  $\rho$  de Spearman, con intervalos de confianza de 95 % (IC 95 %). Los análisis fueron de dos colas con una  $p < 0.05$  como indicativa de significación estadística. Para los cálculos se utilizó

GraphPad Prism versión 9.3.1 (GraphPad Inc., Estados Unidos).

Se crearon redes de interacción proteína-proteína con análisis de enriquecimiento funcional para los mediadores solubles identificados como diferentes en función de los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 mediante el programa STRING versión 11.5, de libre acceso online en <https://string-db.org><sup>14</sup> (accesos registrados entre enero y marzo de 2022).



**Figura 2.** Niveles séricos de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21. Los niveles de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 fueron más altos en pacientes con esclerosis sistémica (ES) que en aquellos con síndrome de Sjögren (SS) o lupus eritematoso sistémico (LES). Mediana: 57 U/mL versus 30 U/mL versus 0 U/mL, respectivamente;  $p = 0.016$  para comparaciones múltiples y  $p$  no significativa en análisis posprueba. Las líneas verticales indican valores medianos. Punto de corte para positividad = 25 U/mL.

## Resultados

Se reclutaron 167 pacientes con ERAS, cuyo diagnóstico primario fue LES en 143 (85 %), SS en 16 (9 %) y ES en ocho (4 %). La mediana de edad fue de 41 años (18-81) y 149 fueron mujeres (89 %). La Tabla 1 resume los datos clínicos y de laboratorio.

En cuanto a los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21, 41 pacientes (24 %) fueron positivos. La seropositividad fue mayor en ES (62 %) y SS (50 %) en comparación con LES (19 %) ( $p = 0.028$ ). Posprueba: ES versus LES,  $p = 0.012$ ; SS versus LES,  $p = 0.010$ ; ES versus SS,  $p = 0.679$ ). Además, los pacientes con anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 tenían niveles más bajos de complemento C4 (13.4, 1.7-29.0 mg/L versus 17.0, 1.5-43.8 mg/L,  $p = 0.003$ ) y una mayor seropositividad para anti-Ro/SSA (100 % versus 23 %,  $p < 0.0001$ ) y anti-La/SSB (41 % versus 8 %,  $p < 0.0001$ ). Otras variables se presentan en la Tabla 1. La titulación de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 (Figura 2) fue mayor en pacientes con ES (57, 0-105 U/mL), intermedia en SS (30, 0-94 U/mL) y menor en LES (0, 0-123 U/mL,  $p = 0.016$  para comparaciones múltiples;  $p$  no significativa en análisis posprueba).

La Tabla 2 muestra los niveles de mediadores solubles según la presencia de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21. Hubo diferencias significativas en los niveles de interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

(GM-CSF), IL-21 e IL-22 entre pacientes con anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 positivos y negativos. Mientras que varias citocinas fueron indetectables, las quimiocinas analizadas se detectaron consistentemente en casi todas las muestras. En este sentido, los niveles más altos de las quimiocinas CCL4, CXCL8, CXCL10 y CXCL12 se encontraron en pacientes con anticuerpos anti-Ro52/TRIM21. Finalmente, la concentración de hs-CRP fue mayor en pacientes con anticuerpos anti-TRIM21 positivos, mientras que no hubo diferencia en los niveles de proteína amiloide A sérico.

Se evaluó la asociación entre los títulos de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y los mediadores solubles (Tabla 3). Como se observa en la Figura 3, anti-Ro52/TRIM21 mostró una asociación directa con los niveles de IL-2 ( $\rho = 0.21$ ), IL-4 ( $\rho = 0.18$ ), IL-6 ( $\rho = 0.18$ ), IL-10 ( $\rho = 0.18$ ), IL-21 ( $\rho = 0.30$ ), IL-22 ( $\rho = 0.23$ ), CXCL10 ( $\rho = 0.22$ ) y hs-CRP ( $\rho = 0.22$ ), así como asociación inversa con C3 ( $\rho = -0.17$ ) y C4 ( $\rho = -0.20$ ).

La asociación potencial entre los niveles de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y la actividad de la enfermedad fue evaluada en los pacientes con LES, ya que constituían la población más numerosa. Como se puede apreciar en la Figura 4A, la actividad de la enfermedad no mostró correlación con los niveles de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 ( $\rho = -0.003$ ,  $p = 0.971$ ). Del mismo modo, no encontramos diferencias según la afectación neuropsiquiátrica, vasculítica, articular, renal, hematológica, mucocutánea o serosa (Figura 4B).

Finalmente, las redes de interacción proteína-proteína mostraron interacciones entre la molécula TRIM21 y diferentes mediadores inflamatorios, principalmente a través de los factores de transcripción IRF3, IRF5, IRF7 y NF- $\kappa$ B (vía su sistema inhibitorio). Estas interacciones se observaron más allá de las esperadas por casualidad y se basaron en relaciones determinadas tanto experimentalmente como por minería de texto (Figura 5).

## Discusión

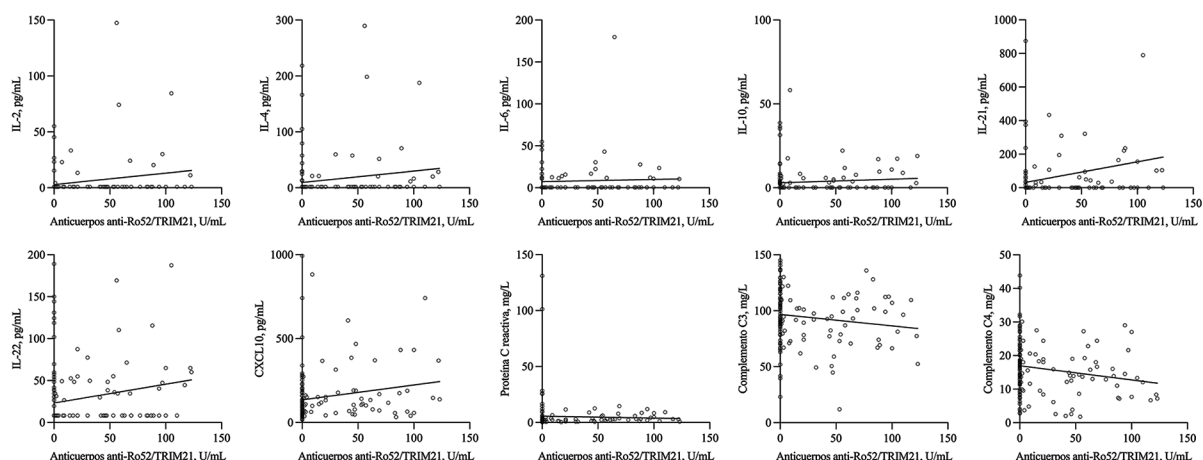
En este estudio encontramos que los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 están asociados a una respuesta aberrante del circuito de citocinas del fenotipo Th17 y elevados niveles de moléculas angiogénicas y quimioatrayentes para neutrófilos y monocitos. Esta respuesta anormal se produce independientemente de la actividad de la enfermedad o de la afectación de un órgano específico.

Los autoanticuerpos circulantes se consideran el sello distintivo de las ERAS y la forma como pueden

**Tabla 2.** Niveles séricos de los marcadores inflamatorios en suero

Marcador	Anticuerpos anti-Ro52/TRIM21				p
	Positivos (n = 41)		Negativos (n = 126)		
	Mediana	Mín.-máx.	Mediana	Mín.-máx.	
<b>Citocinas (pg/mL)</b>					
Interleucina-27	5	5-1393	5	5-487	0.176
Interleucina-1β	0	0-46	0	0-27	0.064
Interleucina-2	0	0-147	0	0-55	0.035
Interleucina-4	1	1-289	1	1-218	0.009
Interleucina-5	0	0-282	0	0-74	0.228
Interleucina-6	0	0-179	0	0-416	0.040
Interleucina-10	0	0-22	0	0-58	0.069
Interleucina-12p70	0	0-27	0	0-137	0.268
Interleucina-13	0	0-19	0	0-28	0.176
Interleucina-17A	0	0-32	0	0-92	0.547
Interferón-gama	63	0-463	42	0-433	0.100
GM-CSF	1	1-273	1	1-160	0.035
Factor de necrosis tumoral	7	0-149	0	0-137	0.066
Interleucina-9	0	0-17	0	0-21	0.418
Interleucina-23	0	0-275	0	0-82	0.106
Interleucina-18	71	0-379	56	0-1063	0.326
Interleucina-21	0	0-2389	0	0-874	0.001
Interleucina-22	8	8-187	8	8-189	0.007
<b>Quimiocinas (pg/mL)</b>					
CCL2 (MCP-1)	214	41-1210	187	14-3943	0.301
CCL3 (MIP-1α)	72	13-423	49	4-560	0.263
CCL4 (MIP-1β)	326	170-739	263	130-716	0.034
CCL5 (RANTES)	248	75-1645	173	43-8870	0.168
CCL11 (eotaxina)	67	13-487	59	6-435	0.394
CXCL1 (GRO-α)	58	13-167	41	5-357	0.066
CXCL8 (interleucina-8)	16	3-88	12	0-179	0.032
CXCL10 (IP-10)	135	31-741	91	15-992	0.007
CXCL12 (SDF-1)	864	374-2727	718	0-3754	0.039
<b>Pentrxinas</b>					
hs-CRP (mg/L)	2.9	0.5-14.6	1.7	0-131.0	0.007
Proteína amiloide A (ng/mL)	63	0-146	66	0-147	0.719

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; hs-CRP: proteína C reactiva de alta sensibilidad.



**Figura 3.** Asociación entre el título de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y marcadores inflamatorios. Gráficos con los análisis de correlación que mostraron una asociación significativa entre los niveles de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y diferentes mediadores inflamatorios solubles. Los valores de los coeficientes  $\rho$  de Spearman se presentan en el texto. La línea de regresión se traza en cada gráfico.

**Tabla 3. Análisis de correlación entre los títulos de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y los niveles séricos de marcadores inflamatorios**

Marcador	Coefficiente $\rho$ de Spearman	IC 95 %	p
Interleucina-27	0.09	-0.08 a 0.25	0.288
Interleucina-1 $\beta$	0.10	-0.06 a 0.26	0.208
Interleucina-2	0.21	0.04 a 0.36	0.012
Interleucina-4	0.18	0.01 a 0.34	0.026
Interleucina-5	0.12	-0.04 a 0.28	0.153
Interleucina-6	0.18	0.02 a 0.34	0.025
Interleucina-10	0.18	0.02 a 0.34	0.027
Interleucina-12p70	0.08	-0.08 a 0.24	0.351
Interleucina-13	0.09	-0.07 a 0.25	0.291
Interleucina-17A	0.03	-0.14 a 0.20	0.709
Interferón-gama	0.09	-0.08 a 0.25	0.292
GM-CSF	0.15	-0.02 a 0.30	0.077
Factor de necrosis tumoral	0.11	-0.05 a 0.27	0.170
Interleucina-9	0.06	-0.10 a 0.23	0.433
Interleucina-23	0.14	-0.03 a 0.30	0.092
Interleucina-18	0.06	-0.11 a 0.22	0.504
Interleucina-21	0.30	0.14 a 0.44	0.0002
Interleucina-22	0.23	0.07 a 0.38	0.004
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	0.09	-0.08 a 0.26	0.287
CXCL12 (SDF-1)	0.12	-0.06 a 0.28	0.175
CXCL10 (IP-10)	0.22	0.05 a 0.38	0.008
CXCL8 (interleucina-8)	0.16	-0.01 a 0.32	0.059
CCL11 (eotaxina)	0.05	-0.13 a 0.22	0.583
CCL5 (RANTES)	0.05	-0.15 a 0.25	0.616
CCL4 (MIP-1 $\beta$ )	0.10	-0.07 a 0.26	0.241
CCL2 (MCP-1)	0.03	-0.14 a 0.20	0.733
CXCL1 (GRO- $\alpha$ )	0.12	-0.06 a 0.28	0.172
hs-CRP	0.22	0.05 a 0.38	0.008
Proteína amiloide A	0	-0.17 a 0.17	0.978
VSG	0.14	-0.04 a 0.31	0.117
Complemento C3	-0.17	-0.32 a 0	0.048
Complemento C4	-0.20	-0.35 a -0.03	0.016

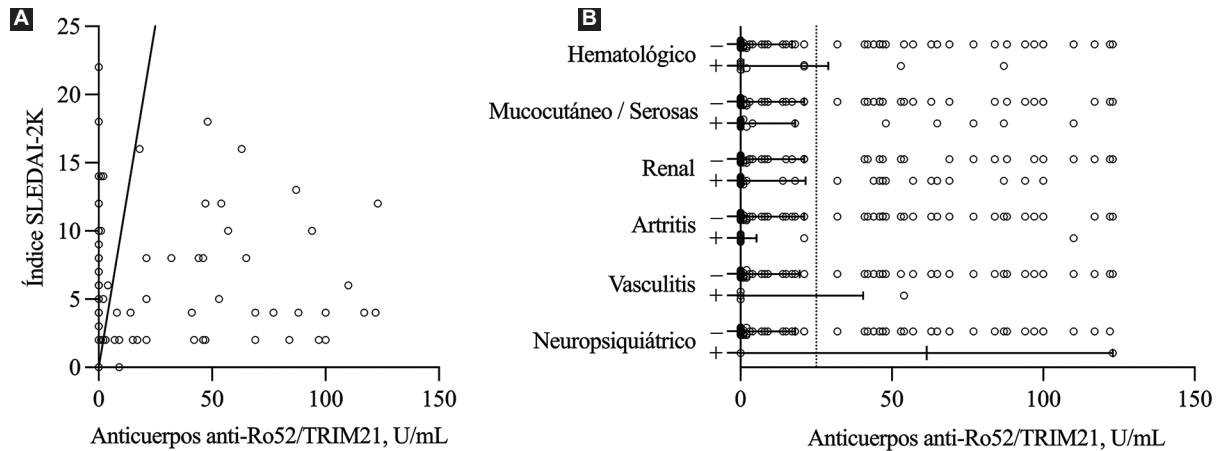
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; hs-CRP: proteína C reactiva de alta sensibilidad; IC 95 %: intervalo de confianza de 95 %; VSG: velocidad de sedimentación globular.

unirse a los antígenos intracelulares para producir alteraciones funcionales ha sido objeto de una intensa investigación.<sup>15</sup> Alarcón Segovia *et al.* demostraron por primera vez la capacidad de algunos anticuerpos anti-ribonucleoproteína para penetrar en las células a través de los receptores Fc-gamma.<sup>16</sup> Posteriormente, se ha mostrado la capacidad de otros autoanticuerpos para internarse en células vivas y producir alteraciones funcionales, incluso mediante mecanismos independientes a los de los receptores Fc-gamma.<sup>17-20</sup>

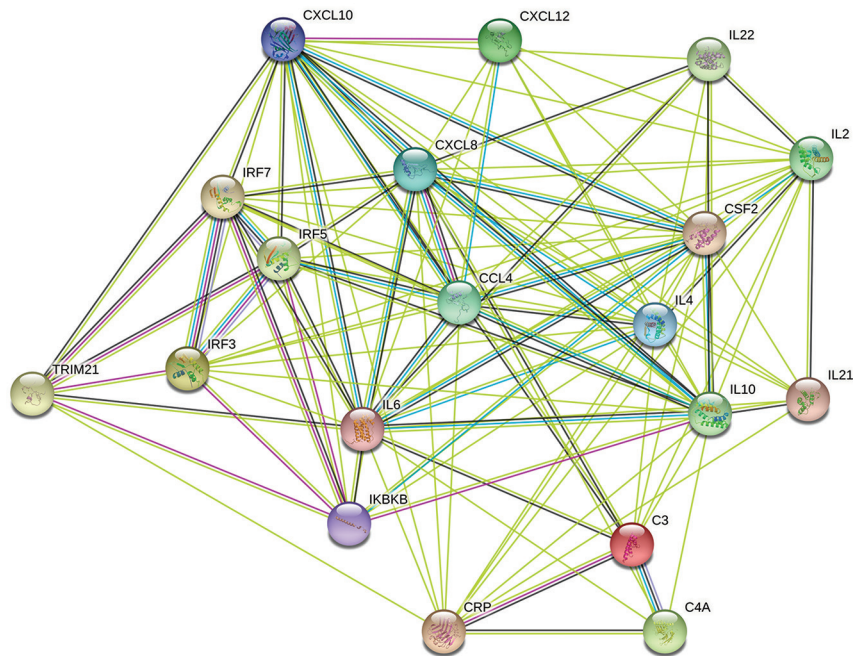
En cuanto a los anticuerpos anti-TRIM21, se ha observado que los obtenidos de pacientes con LES o SSp se dirigen característicamente al dominio RING funcionalmente activo de la molécula TRIM21 (dominio con actividad de ligasa E3), por lo que pueden inhibir la actividad de ligasa bloqueando estéricamente la interacción E3/E2.<sup>2,8</sup> La degradación de proteínas mediada por ubiquitinación regula múltiples procesos celulares, incluido el control del ciclo celular, la transducción de señales, la reparación del ADN, la autofagia y la apoptosis.<sup>4,21</sup>

Algunos factores de transcripción responsables de la producción de interferones tipo I, como IRF3, son reconocidos por la molécula TRIM21 para la degradación mediada por ubiquitina, lo que da como resultado una regulación a la baja de la producción de interferones tipo I.<sup>4</sup> Paralelamente, NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción crítico en una amplia variedad de eventos celulares. En las células en reposo, el NF- $\kappa$ B está secuestrado en el citoplasma por la proteína inhibidora I $\kappa$ B (I $\kappa$ B). El NF- $\kappa$ B puede activarse transitoriamente a través de receptores de la superficie celular, como el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), el receptor tipo Toll 4 o el receptor de lipopolisacáridos.<sup>3</sup> Estos inductores conducen a la activación del complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK), que a su vez fosforila I $\kappa$ B, haciéndolo susceptible a la ubiquitinación mediada por TRIM21 con la subsiguiente degradación proteasómica. La degradación de I $\kappa$ B permite que el NF- $\kappa$ B libre se traslade al núcleo, donde promueve la transcripción de múltiples genes implicados en la inflamación, la oncogénesis y la apoptosis. Curiosamente, TRIM21 también puede ubiquitinar IKK, lo que facilita su degradación; por lo tanto, el efecto neto de TRIM21 es como un potente regulador negativo de la señalización de NF- $\kappa$ B al prevenir la fosforilación de I $\kappa$ B a través de IKK.<sup>3</sup>

Dada la relevancia de TRIM21 como regulador de la respuesta de citocinas, es intuitivo que los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 ejerzan un efecto facilitador en



**Figura 4.** Anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico. **A:** el análisis de correlación de Spearman no mostró una asociación lineal entre los niveles de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y la actividad de la enfermedad evaluada mediante el índice SLEDAI-2K ( $p = 0.003$ , IC 95 % =  $-0.181$  a  $0.175$ ,  $p = 0.971$ ). **B:** no se encontraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 según la presencia de daño órgano-específico en pacientes con LES. Las líneas horizontales denotan valores medianos con rango intercuartílico.



**Figura 5.** Redes de interacción proteína-proteína con análisis de enriquecimiento funcional. Interacciones entre la molécula TRIM21 y citocinas, quimiocinas y pentraxinas, utilizando como intermediarios los factores de transcripción IRF3, IRF5, IRF7 y NF- $\kappa$ B (a través de su sistema inhibitorio, IKBKB). Se encontraron interacciones más allá de las esperadas por casualidad, tanto en relaciones demostradas experimentalmente (líneas rosas) como en relaciones identificadas mediante minería de texto (líneas verdes). Creado con STRING: Functional Protein Association Networks.

la producción de mediadores inflamatorios. Un estudio reciente demostró que los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 están asociados a la sobreproducción de interferones tipos I y II, así como a la hiperactivación de los linfocitos B, con el consiguiente aumento de la

producción de inmunoglobulinas.<sup>7</sup> Este estudio también mostró diferencias en la concentración sérica de IL-6, IL-10 y de las quimiocinas de respuesta a interferón CXCL8 y CXCL10.<sup>7</sup> Además, se ha observado que las células mononucleares con expresión



deficiente de TRIM21 de pacientes con miopatías inflamatorias muestran un fenotipo inflamatorio caracterizado por una mayor producción de IL-6, interferón- $\alpha$  y TNF.<sup>6</sup> Asimismo, las células CD4+ deficientes en TRIM21 se caracterizan por sobreproducción de IL-17, una citocina prototípica del fenotipo Th17.<sup>6</sup> Este hallazgo es relevante para los resultados de nuestro estudio, ya que la diferenciación de los linfocitos efectores hacia Th17 tiene la función de activar los neutrófilos para mantener la homeostasis epitelial en barreras físicas como piel y mucosas. Además, los linfocitos Th17 son potentes inductores de la inflamación tisular y la autoinmunidad.<sup>22</sup>

La diferenciación hacia el fenotipo Th17 está mediada por el factor ROR $\gamma$ t, que a su vez es inducido por citocinas producidas por células dendríticas como IL-6 e IL-21. Una vez polarizadas, las células Th17 ejercen sus acciones produciendo citocinas de la familia IL-17, incluidas IL-17A e IL-22.<sup>22</sup> Es de destacar que los pacientes de nuestro estudio con anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 también tenían los niveles más altos de todas las citocinas pertenecientes al fenotipo Th17, así como del factor de proliferación común a todos los linfocitos, IL-2.

En paralelo con un fenotipo Th17 está la activación de los neutrófilos como células efectoras finales de la respuesta inmune. En nuestro estudio, los pacientes con anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 tuvieron los niveles más altos de CCL4 y CXCL8, que constituyen las principales moléculas de quimioatracción y desgranulación de neutrófilos, lo que facilita la inflamación neutrofílica aguda.<sup>23,24</sup> CXCL10 y CXCL12 inducen poderosas respuestas de quimioatracción para los monocitos y otros leucocitos mientras reclutan células progenitoras endoteliales, regulando así la angiogénesis.<sup>25,26</sup>

Finalmente, en el análisis de redes de interacción proteína-proteína proponemos cómo los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 podrían bloquear el funcionamiento *in vivo* de TRIM21 al inhibir su acción como ubiquitina ligasa E3. Una vez perdida esta función, los factores IRF3, IRF5 e IRF7, así como la vía del NF- $\kappa$ B, permanecerían intactos para regular la transcripción de los genes que impulsan la polarización de las células T hacia el fenotipo Th17, al tiempo que facilitan la producción de factores quimioatrayentes de neutrófilos, monocitos e inductores de angiogénesis, completando el círculo patogénico de circuitos aberrantes de citocinas y quimiocinas asociados a la presencia de anticuerpos anti-Ro52/TRIM21.

A pesar de tener sustento biológico, no podemos omitir la falta de asociación entre los anticuerpos

anti-Ro52/TRIM21 y la actividad de la enfermedad, al menos en LES. Aunque otros tampoco lograron encontrar asociaciones clínicas,<sup>7</sup> se han descrito anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 en bloqueo cardiaco congénito, lupus neonatal, enfermedad valvular, miopatía inflamatoria y enfermedad pulmonar intersticial, lo que sugiere que los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 sí están asociados a reacciones autoinmunes.<sup>27-31</sup> Además, queda por definir si la asociación entre anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 y la respuesta inmune anormal es un proceso estático en el que la mera presencia de anticuerpos condiciona una producción aberrante de citocinas o, por el contrario, si es un fenómeno dinámico donde estos últimos fluctúan continuamente en relación con la actividad de la enfermedad, el funcionamiento de otros anticuerpos, el sustrato genético y otros factores no directamente relacionados con la autorreactividad contra la molécula TRIM21.

## Conclusiones

Los anticuerpos anti-Ro52/TRIM21 se detectan frecuentemente en pacientes con ERAS y su presencia se asocia a circuitos aberrantes de citocinas pertenecientes al fenotipo Th17, así como a niveles elevados de moléculas quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos y de moléculas angiogénicas, lo que sugiere una participación activa de estos anticuerpos en la regulación de los mecanismos de daño tisular que se producen en las ERAS.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Financiamiento

Los autores declaran que el estudio fue financiado por el propio Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

## Bibliografía

- Mora-Arias T, Amezcu-Guerra LM. Type III interferons (lambda interferons) in rheumatic autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2020;68:1.
- Espinosa A, Hennig J, Ambrosi A, Anandapadmanaban M, Abeliu MS, Sheng Y, et al. Anti-Ro52 autoantibodies from patients with Sjögren's syndrome inhibit the Ro52 E3 ligase activity by blocking the E3/E2 interface. *J Biol Chem*. 2011;286:36478-91.
- Wada K, Niida M, Tanaka M, Kamitani T. Ro52-mediated monoubiquitination of IKK(beta) down-regulates NF-κB signalling. *J Biochem*. 2009;146:821-32.
- Higgs R, Ni Gabhann J, Ben Larbi N, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA. The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol*. 2008;181:1780-6.
- Kunishita Y, Yoshimi R, Kamiyama R, Kishimoto D, Yoshida K, Hashimoto E, et al. TRIM21 dysfunction enhances aberrant B-cell differentiation in autoimmune pathogenesis. *Front Immunol*. 2020;11:98.
- Gómez-Martín D, Galindo-Ferías AS, Barrera-Vargas A, Merayo-Chalico J, Juárez-Vega G, Torres-Ruiz J, et al. Ro52/TRIM21-deficient expression and function in different subsets of peripheral blood mononuclear cells is associated with a proinflammatory cytokine response in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Clin Exp Immunol*. 2017;188:154-62.
- Kunishita Y, Yoshimi R, Kamiyama R, Kishimoto D, Komiya T, Sakurai N, et al. Anti-TRIM21 antibody is associated with aberrant B-cell function and type I interferon production in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2021;30:2054-65.
- Kvarnström M, Dzikaite-Ottosson V, Ottosson L, Gustafsson JT, Gunnarsson I, Svenungsson E, et al. Autoantibodies to the functionally active RING-domain of Ro52/SSA are associated with disease activity in patients with lupus. *Lupus*. 2013;22:477-85.
- Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64:2677-86.
- Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69:35-45.
- van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:1747-55.
- Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002;29:288-91.
- Amezcu-Guerra LM, Márquez-Velasco R, Chávez-Rueda AK, Castillo-Martínez D, Massó F, Páez A, Colín-Fuentes J, et al. Type III Interferons in systemic lupus erythematosus: association between interferon λ3, disease activity, and anti-Ro/SSA antibodies. *J Clin Rheumatol*. 2017;23:368-75.
- String [Internet]. Disponible en: <https://string-db.org>
- Andrade LEC, Damoiseaux J, Vergani D, Fritzler MJ. Antinuclear antibodies (ANA) as a criterion for classification and diagnosis of systemic autoimmune diseases. *J Transl Autoimmun*. 2022;5:100145.
- Alarcón-Segovia D, Ruiz-Argüelles A, Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature*. 1978;271:67-9.
- Deng SX, Hanson E, Sanz I. *In vivo* cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *Int Immunol*. 2000;12:415-23.
- Zack DJ, Stempniak M, Wong AL, Taylor C, Weisbart RH. Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody. *J Immunol*. 1996;157:2082-8.
- Ma J, King N, Chen SL, Penny R, Breit SN. Antibody penetration of viable human cells. II. Anti-RNP antibodies binding to RNP antigen expressed on cell surface, which may mediate the antibody internalization. *Clin Exp Immunol*. 1993;93:396-404.
- Hormigo A, Ball C, Lieberman F. Internalization of anti-Hu IgG is not Fc gamma receptor mediated. *Neurology*. 1996;47:607-9.
- Kimura T, Jain A, Choi SW, Mandell MA, Schroder K, Johansen T, et al. TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J Cell Biol*. 2015;210:973-89.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008;453:1051-7.
- Menten P, Wuyts A, van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:455-81.
- Struyf S, Proost P, van Damme J. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. *Adv Immunol*. 2003;81:1-44.
- Booth V, Keizer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry*. 2002;41:10418-25.
- Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50:274-80.
- Wodkowski M, Hudson M, Proudman S, Walker J, Stevens W, Nikpour M, et al. Monospecific anti-Ro52/TRIM21 antibodies in a tri-nation cohort of 1574 systemic sclerosis subjects: evidence of an association with interstitial lung disease and worse survival. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33:S131-5.
- Buvry C, Cassagnes L, Tekath M, Artigues M, Pereira B, Rieu V, et al. Anti-Ro52 antibodies are a risk factor for interstitial lung disease in primary Sjögren syndrome. *Respir Med*. 2020;163:105895.
- Higuera-Ortiz V, Mora-Arias T, Castillo-Martínez D, Amezcu-Guerra LM. Anti-Ro/SSA antibodies are associated with severe mitral valve regurgitation in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol*. 2017;27:476-80.
- Yoshimi R, Ueda A, Ozato K, Ishigatsubo Y. Clinical and pathological roles of Ro/SSA autoantibody system. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:606195.
- Decker P, Moulinet T, Pontille F, Cravat M, De Carvalho Bittencourt M, Jaussaud R. An updated review of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies impact in connective tissue diseases clinical management. *Autoimmun Rev*. 2022;21:103013.