



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSTGRADO

Alteraciones funcionales del timo en el modelo murino NZBWF1 de lupus eritematoso sistémico

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al grado de:

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Yessia Hidalgo Fadic

Junio, 2018

Director de tesis: Dra. María Rosa Bono
Co-Director de Tesis: Dra. Daniela Sauma

Santiago, Chile

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Yessia Hidalgo Fadic

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 9 de abril del año 2018.

Director de Tesis:

Dra. María Rosa Bono

Co-Director de Tesis:

Dra. Daniela Sauma

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Álvaro Glavic

Dr. Flavio Salazar

Dr. Alejandro Roth

Dr. Diego Catalán

A mis padres, hermanos y Edu.

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Yessia Hidalgo, nací el 9 de octubre de 1986 en Arica, Chile. A los 2 años viajamos junto a mi familia a Santiago por razones del trabajo de mi padre, de ahí toda mi vida se desarrolló en Santiago.

En el colegio siempre mostré inclinaciones hacia las áreas de biología y química. En la enseñanza media ya sabía que quería ser científica. Fue así como el año 2006 ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile. A través de los cursos e ir familiarizándome con las distintas áreas científicas me interesó conocer más sobre el sistema inmune. El año 2010 ingresé al laboratorio de Inmunología de la Dra. María Rosa Bono. Inicialmente realicé una unidad de investigación y luego desarrollé mi Seminario de Título relacionado con buscar terapias para la aceptación de trasplantes. Luego, el año 2012 trabajé en este mismo laboratorio produciendo anticuerpos que diferenciaran espermios bovinos X de Y. Posteriormente, el año 2013 ingresé al Doctorado en Ciencias con mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencia de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y después de aprobar los cursos continué en este laboratorio para desarrollar mi tesis Doctoral. Esta vez el estudio se realizó en un modelo de lupus murino que se asemeja al lupus eritematoso sistémico en humanos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora la Dra. María Rosa Bono por permitirme trabajar en su laboratorio, apoyar muchas de mis ideas y por la enorme confianza que ha depositado en mí.

Al Dr. Mario Roseblatt y la Dra. Daniela Sauma quiero agradecerles por su buena disposición, consejos y sugerencias en los experimentos y por sus útiles aportes en las reuniones de laboratorio.

A las personas que conforman Inmunolab, gracias por hacer más amena la estadía en el laboratorio. Leonardo gracias por ser mi amigo, excelente compañero de trabajo y siempre estar dispuesto a ayudarme. A las personas que permiten que funcione el laboratorio Pamela, Zoila y Oscar, gracias por la buena voluntad a ayudarme. A Sarah gracias por ser tan generosa con tus conocimientos, por tus ideas y recomendaciones a mis experimentos. A Gabriela, agradezco la buena disposición para leer mis escritos. Nicolás gracias por estar siempre dispuesto a ayudar. Gabriela y Nicolás, mis compañeros de grupo, fue un agrado trabajar con ustedes.

A los que ya no están en el laboratorio pero formaron parte de él durante mi estadía, Felipe gracias por tus aportes y tu valiosa colaboración a mi investigación, a Dominique y Bárbara por su buena disposición siempre y por la buena energía que aportaban al laboratorio. María José gracias por empezar conmigo este proyecto y poner todo de tu parte para que funcionara, sin importar la hora y aún después de irte, seguir dispuesta ayudarme. Camila gracias por tu generosidad con tus resultados, datos y todo cuanto leías. Paulina, gracias por tu comprensión y por escucharme siempre.

A los compañeros de la fundación Francisco Osorio gracias por las conversaciones de ciencia y de no ciencia, pero por sobretodo por ser tan buen amigo. Cristian Doñas, fue un agrado trabajar contigo, tanto como cuando te ayudaba como cuando tu lo hacías conmigo. A ambos, gracias por la disposición a prestar reactivos sin pedir muchas explicaciones.

A mis compañeros de Doctorado Fernanda, Juan José, Andrea y Rodrigo les agradezco que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando lo necesité.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a mi familia, mis padres y hermanos, por permitirme cumplir mis sueños y apoyarme siempre, aún sin entender muy bien lo que hago. A Eduardo, gracias por toda tu comprensión, apoyo y compañía durante todos estos años. A mis suegros, les agradezco que siempre tuvieron palabras de ánimo para las situaciones difíciles.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento de mi beca CONICYT 21130598 y de los proyectos FONDECYT 1140431, FONDECYT 1180385, PFB-16 y AFB 170004.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
2.1. HIPÓTESIS	19
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	19
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. MATERIALES.....	20
3.1.1. Animales	20
3.1.2. Anticuerpos.....	21
3.1.3. Reactivos.....	22
3.1.4. Equipos.....	23
3.1.5. Programas	23
3.2. MÉTODOS	24
3.2.1. Obtención de suero a partir de sangre de ratones.....	24
3.2.2. ELISA para la detección de anticuerpos anti-ADN doble hebra.....	24
3.2.3. Aislamiento de células de timo, bazo y médula ósea.....	25

3.2.4. Citometría de flujo para marcadores de superficie en linfocitos provenientes de órganos linfoides.....	26
3.2.5. Citometría de flujo para la detección intracelular de Ki-67.....	26
3.2.6. Cocultivo de linfocitos B de timo con timocitos.....	27
3.2.7. Cocultivo de linfocitos T foliculares con linfocitos B de timo.....	29
3.2.8. ELISpot.....	30
3.2.9. Inmunofluorescencia de tejido congelado.....	31
3.2.10. Inmunofluorescencia de rebanadas de tejido.....	32
3.2.11. Estadística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Alteraciones en el timo durante el desarrollo del lupus.....	34
4.2. Homeostasis alterada de las subpoblaciones de timocitos durante el desarrollo del lupus.....	35
4.3. El timo de ratones lúpicos tiene principalmente linfocitos T de memoria y efectores.....	38
4.4. El timo de ratones lúpicos tiene aumentada la población de linfocitos B....	45
4.5. Receptores de migración celular en los linfocitos B del timo de ratones lúpicos y ratones controles.....	48
4.6. Los linfocitos B del timo de ratones lúpicos se agrupan en estructuras similares a centros germinales lo que se correlaciona con un aumento de las células plasmáticas.....	51

4.7. Las células plasmáticas del timo de ratones lúpicos secretan auto-anticuerpos.....	58
4.8. Los linfocitos T foliculares presentes en el timo del ratón lúpico activan a linfocitos B de timo.....	61
4.9. Los linfocitos B del timo de ratones lúpicos favorecen la diferenciación de los timocitos a linfocitos T foliculares.....	63
5. DISCUSIÓN	65
6. RESUMEN DE RESULTADOS	79
7. CONCLUSIÓN	81
8. BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ratones enfermos de lupus presentan baja celularidad en el timo.....	35
Figura 2. Las subpoblaciones de timocitos se encuentran alteradas en ratones enfermos de lupus.....	37-38
Figura 3. La población CD4SP madura e inmadura se encuentra reducida en el timo de ratones enfermos de lupus.....	40
Figura 4. La población de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria se encuentra aumentada en el timo en ratones enfermos de lupus.....	41
Figura 5. La población de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria residente de tejido CD103 ⁺ CD69 ⁺ se encuentra aumentada en el timo en ratones enfermos de lupus.....	43
Figura 6. La población de linfocitos T foliculares se encuentra aumentada en el timo de ratones enfermos de lupus.....	45
Figura 7. Ratones enfermos de lupus presentan un aumento de linfocitos B en el timo	47
Figura 8. Linfocitos B del timo de ratones lúpicos y controles viejos expresan niveles similares de moléculas de coestimulación y de presentación de antígenos.....	48
Figura 9. Expresión de los receptores de quimioquinas CXCR3, CXCR5 y CCR9 en los linfocitos B de timo.....	50
Figura 10. Una proporción de los linfocitos B del timo de ratones lúpicos proliferan.....	52
Figura 11. Poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria swlg ⁺ y de memoria IgM ⁺ en timo de ratones controles viejos y lúpicos.....	53
Figura 12. Distribución anatómica de los linfocitos B en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpico.....	55
Figura 13. La población de células plasmáticas se encuentra aumentada en el timo del ratón lúpico.....	57
Figura 14. El timo de ratones enfermos de lupus tiene células secretoras de autoanticuerpos de tipo IgG.	60

Figura 15. Los autoanticuerpos específicos contra ADN del timo del ratón lúpico no son de tipo IgM..... 61

Figura 16. Linfocitos T foliculares provenientes de timo de ratones lúpicos activan a los linfocitos B de timo a un nivel similar de lo que ocurre con las células de bazo..... 63

Figura 17. Linfocitos B provenientes de timo de ratones lúpicos generan un aumento de linfocitos T foliculares..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA:	Anticuerpo Antinuclear
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNdh:	ADN de doble hebra
APC:	Célula presentadora de antígeno (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
ARN:	Ácido ribonucleico
BCR:	Receptor del linfocito B (<i>B Cell Receptor</i>)
BSA:	Seroalbúmina de bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
DN:	Doble negativo
DP:	Doble positiva
EDTA:	Ácido etilendiaminetetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>)
EIISpot:	<i>Enzyme-linked Immunospot</i>
FBS:	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FITC:	Isotiocianato de Fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FMO:	Control de Fluorescencia en Citometría de Flujo (<i>Fluorescence Minus One</i>)
IFN:	Interferón
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
LES:	Lupus Eritematoso Sistémico

IMF:	Intensidad media de fluorescencia
MHC-I:	Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I (<i>Major Histocompatibility Complex of Class I</i>)
MHC-II:	Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II (<i>Major Histocompatibility Complex of Class II</i>)
NZB:	<i>New Zealand Black</i>
NZW:	<i>New Zealand White</i>
(NZBxNZW)F1:	Primera generación de crías de una cruce entre ratones NZB y NZW
PE:	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
PBS:	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PI:	Yoduro de propidio
pMHC:	péptido-MHC
Receptor Fc:	Receptor de la Fracción constante de las inmunoglobulinas
RPMI:	Medio de cultivo (<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
SP:	<i>Single positive</i>
ADNdh:	ADN doble hebra
ADNmc:	ADN monocatenario
TCR:	Receptor del linfocito T (<i>T Cell Receptor</i>)

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de autoanticuerpos que forman complejos inmunes, los cuales son los responsables de la inflamación y daño tisular. En el LES, los linfocitos B son mediadores claves en el desarrollo de la enfermedad, dado que se diferencian a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Sin embargo, se ha demostrado que los linfocitos T también cumplen un papel importante en esta enfermedad ya que proveen a los linfocitos B de señales para activarse y diferenciarse a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.

El timo es un órgano linfoide primario dedicado a la generación y maduración de linfocitos T. Antecedentes recientes de la literatura han demostrado que el timo de personas adultas no sólo cumpliría una función en el desarrollo de los linfocitos T, sino que además el timo alojaría linfocitos B e incluso actuaría como nicho de células plasmáticas productoras de anticuerpos anti antígenos virales. Más aún, estudios previos de nuestro laboratorio en el modelo murino de LES NZBWF1, han demostrado que el timo de ratones enfermos de lupus presenta importantes alteraciones en las poblaciones celulares, como cambios en las proporciones de linfocitos T e interesantemente un aumento en la población de linfocitos B en comparación a animales sanos. El conjunto de estos antecedentes nos llevó a estudiar la contribución de los linfocitos T y B presentes en el timo de ratones lúpicos NZBWF1 en el desarrollo de la respuesta humoral autoinmune.

Nuestros resultados indican que animales enfermos presentan una involución tímica exacerbada en comparación a animales que no se han enfermado, junto con una pérdida de la estructura normal del timo determinada por las zonas de corteza y médula. Asociado a este fenómeno, observamos alteraciones en las subpoblaciones de timocitos, que son las células en diferenciación que originarán finalmente a los linfocitos T. En ratones enfermos, observamos que los timocitos $CD4^+$ en vías de diferenciación disminuyen y aumentan los linfocitos T $CD4^+$ de memoria y linfocitos T foliculares. Por otro lado, existe un aumento en la frecuencia de linfocitos B en el timo previo al desarrollo de la enfermedad, pero el aumento más significativo de linfocitos B en el timo ocurre una vez que se desarrolla el LES. De manera interesante, los linfocitos B cambian su distribución en el timo de ratones enfermos, formando estructuras similares a un centro germinal. Mas aún, en el timo de ratones enfermos existe un mayor número de linfocitos B que expresan Ki-67 comparado a ratones sanos, indicando que estos linfocitos se encuentran proliferando. Además demostramos que en el timo de animales enfermos hay un aumento de células que secretan anticuerpos de tipo IgG e IgM, entre las cuales una proporción de ellas producía autoanticuerpos IgG contra ADN, un autoantígeno del LES. Dado que los linfocitos T foliculares presentes en el timo del ratón lúpico activan *in vitro* a los linfocitos B, nuestros resultados sugieren que en el timo de los ratones enfermos existen linfocitos B que se están diferenciando en células plasmáticas productoras de autoanticuerpos. Finalmente, demostramos *in vitro* que los linfocitos B del timo de ratones lúpicos favorecen la diferenciación de timocitos a linfocitos T foliculares.

En conclusión, la acumulación de linfocitos B en el timo de ratones lúpicos participaría en la expansión de linfocitos T foliculares en este órgano, los que a su vez podrían favorecer la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas autorreactivas. Nuestros resultados sugieren que el timo constituye un nicho que promueve la mantención de la respuesta humoral autoinmune en el modelo murino NZBWF1 de lupus.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the production of antibodies that form immune complexes, which induce inflammation and tissue damage. In SLE, B cells are key mediators of the disease development, since they differentiate into antibody-secreting cells. However, it has been demonstrated that T cells also play an important role in this disease, by delivering signals that activate and differentiate B cells into antibody-secreting plasma cells.

The thymus is a primary lymphoid organ dedicated to T cell generation and maturation. Recent reports in the literature have shown that the thymus of adult individuals, not only maintains its role in T cell development, but also harbors B cells and even acts as a niche of plasma cells that produce antibodies against viral antigens. Moreover, previous work in our laboratory using the SLE murine model NZBWF1, found that the thymus of lupus-diseased mice have important alterations in its cellular composition, such as changes in T cells proportions and a remarkable increase in B cells compared to healthy mice. This converging evidence led us to study the contribution of T and B cells present in the thymus of diseased NZBWF1 mice during the development of the autoimmune humoral response.

Our results indicate that diseased mice show an exacerbated thymic involution compared to animals that have not yet developed the disease, together with a loss of normal thymic structure composed of cortex and medulla. Associated to this phenomenon, we observed alterations in the thymocyte subpopulations, which are cells

undergoing differentiation that give rise to T cells. In diseased mice, we observed that immature CD4⁺ thymocytes decrease while memory CD4⁺ T cells and follicular T cells are increased. On the other hand, there is a higher frequency of B cells in the thymus prior to the onset of the disease, but the most significant increase occurs once mice have developed SLE. Interestingly, B cells change their distribution in the thymus of diseased mice, forming germinal center-like structures. Moreover, in the thymus of diseased mice thymus there is a higher number of B cells expressing Ki-67 compared to healthy mice, indicating that B cells are proliferating. Also, we demonstrated that in the thymus of diseased mice there is an increase of cells that secrete IgG and IgM antibodies among which a fraction produced IgG autoantibodies against DNA, an autoantigen of SLE. Follicular T cells present in the lupic mouse thymus were shown to induce B cells activation in vitro, suggesting that the thymus of diseased mice contains B cells that are differentiating in antibody-producing plasma cells. Finally, in vitro we demonstrated that thymic B cells from lupic mice favour the differentiation of follicular T cells from thymocytes.

In conclusion, the accumulation of B cells in the thymus of lupic mice could participate in the expansion of follicular helper T cells in this organ, which may in turn promote the activation and differentiation of B cells into autoreactive plasma cells. Our results present novel findings which suggesting that the thymus constitutes a niche that promotes the maintenance of the autoimmune humoral response in the lupus murine model NZBWF1.

1. INTRODUCCIÓN

Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por un conjunto de anormalidades clínicas que varían desde afecciones leves como decaimiento, artritis, dermatitis a otras manifestaciones más graves como compromiso renal o compromiso del sistema nervioso central. La enfermedad se desencadena comúnmente entre los 30 y 50 años, pero se puede presentar a cualquier edad y el 90% de los casos se manifiesta en mujeres. La etiología del LES es desconocida sin embargo se le asocian ciertos factores de riesgo genéticos y no genéticos que permiten el desarrollo de esta enfermedad (Aringer y col., 2016; Gottschalk y col., 2015; MINSAL, 2013). En Chile la incidencia de lupus se estima en 4 casos nuevos por cada 100.000 habitantes al año y la prevalencia se estima en 80 casos por cada 100.000 habitantes (MINSAL, 2013).

Actualmente, los tratamientos para el LES son sólo paliativos y consisten en el uso de anticuerpos que median la eliminación de los linfocitos B, el uso de anti-inflamatorios como glucocorticoides, anti-inflamatorios no esteroideos e inmunosupresores que regulan la respuesta inmune previniendo el daño de los órganos asociados. Sin embargo, el LES es una enfermedad crónica con episodios de actividad y remisión para la que no existe tratamiento curativo (MINSAL, 2013; Ugarte-Gil and Alarcón, 2014)

A nivel inmunológico, la enfermedad de LES se caracteriza por una hiperactividad de los linfocitos T y linfocitos B en contra de antígenos propios. Esta hiperactividad

linfocitaria conduce a la secreción de autoanticuerpos contra componentes nucleares y diversas proteínas propias como ADN, ARN, histonas, ribonucleoproteínas, entre otras. Los autoanticuerpos unidos a sus antígenos forman complejos inmunes que se depositan en el riñón y en las articulaciones. Estos antígenos provienen principalmente de células apoptóticas que no han sido eliminadas de manera eficiente por los macrófagos. El depósito de los complejos inmune en los tejidos activa el sistema del complemento y recluta células inflamatorias, generando inflamación y daño, lo que en el caso del riñón, conlleva a la liberación de proteínas en la orina y el desarrollo de proteinuria (Chang et al., 2009; Gesheva et al., 2014; Li et al., 2010; Yurasov et al., 2005).

Además de la generación de autoanticuerpos y la formación de complejos inmunes como factores claves en el LES, las citoquinas también tienen una contribución importante en el desarrollo de la enfermedad. Entre esas citoquinas se encuentran el Interferón de tipo I (IFN-I), BLYs, IL-6, IL-17 e IL-21. El interferón de tipo I (IFN-I) se produce normalmente frente a una infección viral y en la gran mayoría de los pacientes con LES el IFN-I se encuentra aumentado en el suero. La citoquina BLYs es crucial para la proliferación de los linfocitos B y la secreción de anticuerpos, en los pacientes con LES esta citoquina se encuentra aumentada y se la correlaciona con la presencia de anticuerpos anti-ADNdh (ADN de doble hebra) (Bezalel et al., 2014; Yap and Lai, 2013). La citoquina IL-6 es una citoquina pleiotrópica que afecta tanto a células hematopoyéticas como no-hematopoyéticas y en los pacientes con LES los niveles de IL-6 se encuentran elevados en la sangre. La IL-17 tiene varias funciones dependiendo de la célula blanco. La

IL-17 induce la producción de IL-6, favorece la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas y favorece la migración de células fagocíticas al tejido inflamado. Los pacientes con LES tienen condiciones propicias para el desarrollo de linfocitos T secretores de IL-17, esto dado por la alta producción de IL-6 y de IL-21. La IL-21 es una citoquina producida por linfocitos T diferenciados y células NK, entre ellos los linfocitos T foliculares que son importantes en el establecimiento del centro germinal. Pacientes con LES tienen altos niveles de IL-21 en el suero (Bezalel et al., 2014; Ohl and Tenbrock, 2011; Yap and Lai, 2013). Como se puede observar son varias las citoquinas que se encuentran desreguladas en el LES, las que en su conjunto favorecen la activación y/o migración de linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos, entre otros, permitiendo el desarrollo y la mantención del LES.

Reacción del centro germinal y producción de anticuerpos

Los linfocitos B son las únicas células facultadas para diferenciarse a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas que reconocen epítopos antigénicos. Existen 5 isotipos de Ig: Ig de tipo M (IgM), IgD, IgG, IgA e IgE, cada uno de ellos con diferentes funciones asociadas.

Para que los linfocitos B se transformen en células plasmáticas y de memoria deben recibir ayuda de linfocitos T CD4⁺, específicamente de los linfocitos T foliculares que se caracterizan por expresar el receptor de quimioquina CXCR5 y la molécula

accesoria de coestimulación PD1. Los linfocitos B, una vez que reconocen el antígeno a través del receptor para el antígeno BCR (*B cell receptor*), se activan y proliferan formando un centro germinal dentro del folículo, lugar donde se localizan los linfocitos B en los ganglios. Los linfocitos T foliculares estimulan a los linfocitos B a través de la producción de IL-21 y de la interacción con el ligando de CD40 (Baumjohann y col., 2013; Kuchen y col., 2007; Yang y col., 2016). Interesantemente, los linfocitos T foliculares requieren de la presentación antigénica y de la coestimulación por parte de los linfocitos B para mantener su función de ayuda, de modo que la duración del centro germinal dependerá de la disponibilidad antígenos para ser presentados (Baumjohann y col l., 2013).

El centro germinal es una estructura inducible que se forma clásicamente en los órganos linfoides secundarios a raíz de la proliferación de los linfocitos B que se están activando. El centro germinal se identifica por la expresión del marcador de activación GL7 o el ligando para PNA (*Peanut agglutinin*) en los linfocitos B (Naito y col., 2007; Shinall y col., 2000). En el centro germinal los linfocitos B proliferan, se produce el cambio de clase de las inmunoglobulinas, ocurren eventos de hipermutación somática y se seleccionan los linfocitos B que posean un BCR de mayor afinidad. Luego, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas especializadas en la secreción de anticuerpos y una pequeña proporción de ellos sobreviven como linfocitos B de memoria, los cuales ante un nuevo encuentro con el antígeno producen una respuesta inmune más rápida y eficiente (McHeyzer-Williams y col., 2012; Taylor y col., 2012a). A pesar que se ha descrito que los linfocitos B pueden dar origen a células plasmáticas sin la formación de centros

germinales y sin la estimulación por parte de los linfocitos T foliculares, este tipo de células plasmáticas presentan una vida media más corta en comparación a las células plasmáticas que se generan de linfocitos B que se activaron en el centro germinal (Elgueta y col., 2009; McHeyzer-Williams y col., 2012; Taylor y col., 2012a).

El linfocito T CD4⁺ de ayuda folicular (T_{HF}) reconoce en el linfocito B el mismo péptido que le fue presentado previamente en las moléculas de presentación de antígenos de clase-II o MHC-II (*Major Histocompatibility Complex of Class II*) por la célula dendrítica. Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos profesionales, presentes en todos los tejidos, capaces de migrar a los órganos linfoides secundarios una vez que han capturado antígenos. Estos antígenos son procesados y presentados en las moléculas MHC-II durante la migración de las células dendríticas al órgano linfoide más cercano. Cuando la célula dendrítica interactúa con un linfocito T CD4⁺ vírgen que posee un receptor para el antígeno o TCR (*T cell receptor*) específico para el complejo péptido-MHC-II (pMHC), el linfocito T prolifera y se diferencia en una célula efectora capaz de migrar a un sitio determinado y producir citoquinas que influenciarán el comportamiento de otras células (Cavanagh and Von Andrian, 2002; Cravens and Lipsky, 2002).

Papel histórico del timo en la selección de los linfocitos T

Es ampliamente aceptado que todos los linfocitos T que circulan por el organismo provienen del timo. El timo es un órgano linfoide primario ubicado en la zona superior de la cavidad torácica, el cuál se compone de dos lóbulos y cada lóbulo de múltiples lobulillos.

En cada uno de estos lobulillos se puede discriminar una zona denominada corteza y otra médula. Durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo, acontecen procesos que determinan su selección, supervivencia y posterior salida a la circulación. En estos procesos, son esenciales las células presentadoras de antígenos que se ubican en la corteza y en la médula del timo, las cuales se caracterizan porque presentan péptidos propios (Palmer, 2003).

Los progenitores linfoides que originarán a los linfocitos T migran desde la médula ósea a la corteza del timo para su diferenciación. Los progenitores de los linfocitos T carecen del receptor para el antígeno (TCR), que está formado de una cadena α y una β , y son denominados timocitos dobles negativos (DN) debido a que no expresan los correceptores CD4 y CD8 ($CD4^-CD8^-$). Los timocitos DN expresan el receptor de IL-7 (CD127), que es necesario para la supervivencia de los linfocitos T (Mackall y col., 2011). Mediante un proceso ordenado de recombinación somática en los linfocitos DN se genera primero la cadena β del TCR, luego la cadena α y además se expresan los correceptores CD4 y CD8, estos timocitos se denominan doble positivos (DP) (Germain, 2002). El timocito DP interactúa a través del TCR con las moléculas MHC-I y MHC-II que contienen péptidos que se originan de proteínas propias expresadas por células epiteliales de la corteza. Cuando el TCR del timocito DP reconoce el complejo pMHC con mediana afinidad recibe señales de supervivencia y se diferencia a una célula CD4SP (*CD4 single positive*) o CD8SP (*CD8 single positive*), dependiendo si el TCR interactuó con un péptido presentado en una molécula MHC-II ó MHC-I, respectivamente. Los timocitos DP que no reconocen

el complejo pMHC o lo reconocen con alta afinidad mueren por apoptosis (Germain, 2002; Klein y col, 2009; Palmer, 2003).

Durante la diferenciación de los timocitos de DP a SP se produce su migración desde la corteza a la médula del timo por un mecanismo dependiente del receptor de quimioquina CCR7. La selección de los timocitos SP ocurre en la médula del timo, donde interactúan con células presentadoras de antígenos presentes en esta zona del timo. Solo las células SP que reconozcan el complejo pMHC con mediana afinidad sobreviven, además los timocitos SP expresan altos niveles de CD69 y bajos niveles de CD62L lo que les permite mantenerse retenidos en el timo en un estado inmaduro durante su selección. Luego los timocitos SP disminuyen la expresión de CD69 y aumentan la expresión de la molécula de adhesión CD62L, lo que les permite emigrar del timo y entrar a los órganos linfoides secundarios como linfocitos T maduros vírgenes (Feng y col., 2002; Teng y col., 2011; Weinreich and Hogquist, 2008).

Las células que emigran desde el timo se denominan linfocitos T vírgenes los cuales se diferencian a linfocitos T efectores o de memoria, en los órganos linfoides secundarios, cuando reconocen en células dendríticas el complejo pMHC con péptidos de proteínas no propias (Morikawa and Sakaguchi, 2014).

La selección de los linfocitos en el timo es un paso fundamental para mantener la tolerancia inmune ya que si este proceso falla, pueden emigrar del timo linfocitos T capaces de activarse frente a antígenos propios. Más aún, los linfocitos T autorreactivos ejercerán su función de ayuda a linfocitos B autorreactivos, induciendo la producción de

autoanticuerpos, lo que desencadena un proceso de autoinmunidad como en el LES (Carl y col., 2008; Takeno y col., 1997).

Células presentadoras de antígenos en el timo

En el timo existen diferentes tipos de células presentadoras de antígenos. En la corteza del timo se encuentran principalmente células epiteliales corticales y en la médula del timo se encuentran células epiteliales medulares, células dendríticas y linfocitos B (Palmer, 2003). Los linfocitos B además de diferenciarse a células plasmáticas, expresan moléculas MHC-II y moléculas de coestimulación que les permite actuar como células presentadoras de antígenos cuando se encuentran en un órgano linfóide secundario (Klein y col., 2009, 2014; Palmer, 2003).

En relación al origen de las células presentadoras de antígenos del timo, las células epiteliales tienen un desarrollo intratímico y nunca migran del timo hacia órganos periféricos o la circulación, mientras que las células dendríticas están representadas por una subpoblación que se diferencia en el timo a partir de progenitores y otra que ingresa al timo desde la circulación (Klein y col., 2014; Li y col., 2009; Proietto y col., 2008; Shortman y col., 2010). El origen de los linfocitos B presentes en el timo aún no es claro, ya que se ha descrito que éstos podrían migrar desde la circulación (Sato y col., 2004). Sin embargo, también se han encontrado progenitores de linfocitos B en el timo los cuales podrían diferenciarse a linfocitos B maduros directamente en este órgano (Mori y col., 1997; Perera y col., 2013). El proceso de diferenciación de los linfocitos B está

ampliamente descrito en la médula ósea, mientras que el origen de los linfocitos B en el timo es un tema aún controversial (Ferrero y col., 1999; Frommer and Waisman, 2010; Klein y col., 2014; Perera y col., 2013).

El timo sufre alteraciones durante el envejecimiento

A lo largo de la edad el timo involuciona como parte de la inmunosenescencia, lo que se traduce en una pérdida de la celularidad del timo, un aumento en el contenido de grasa en este órgano y la disminución de la exportación de linfocitos T vírgenes a la periferia. Este proceso de involución se debe a una capacidad reducida de proliferación y de diferenciación de los progenitores linfoides provenientes de la médula ósea, además de una sensibilidad aumentada a la apoptosis. Los linfocitos T que emigran desde el timo involucionado presentan diferencias en el fenotipo y función, pérdida de diversidad y alteraciones en su capacidad proliferativa (Palmer, 2013; Prelog, 2006).

Por otro lado, se ha descrito que durante la involución tímica se reduce la expresión de IL-7, que es una citoquina que favorece la supervivencia y la proliferación de los timocitos (Andrew and Aspinall, 2002) y además se reduce la expresión del factor de transcripción Aire en las células presentadoras epiteliales de la médula del timo (mTEC). Aire es un factor de transcripción que permite la expresión de proteínas propias de diferentes órganos, favoreciendo la presentación de péptidos provenientes de proteínas propias que no están presentes en el timo. Esto permite la selección y eliminación de los linfocitos T que reconocen antígenos propios con alta afinidad. La baja expresión de Aire

en las mTEC, altera la selección negativa de los timocitos, lo que favorece la salida de linfocitos T autorreactivos a la periferia, induciendo inflamación crónica en el envejecimiento (Coder et al., 2015).

La inmunosenescencia se ha asociado a una reducida habilidad del sistema inmune para generar respuestas antigénicas específicas contra patógenos, lo que conlleva a una mayor incidencia de infecciones, neoplasias o enfermedades autoinmunes (Coder et al., 2015; Palmer, 2013).

Papel del timo en enfermedades autoinmunes

Alteraciones en el timo y en sus componentes celulares han sido observados en algunas enfermedades autoinmunes como miastenia gravis, colitis ulcerativa y el síndrome de Sjögren. La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune que se caracteriza porque el paciente presenta debilidad y fatiga muscular afectando principalmente a los músculos de la cara. Esto se debe a la presencia de autoanticuerpos contra el receptor de acetilcolina, los cuales bloquean o destruyen el receptor, impidiendo la acción del neurotransmisor. En pacientes con miastenia gravis se ha correlacionado los altos títulos de autoanticuerpos con un timo hiperplásico. Además, se ha descrito un aumento considerable de linfocitos B en el timo de estos pacientes e incluso la formación de centros germinales, que favorece la producción de autoanticuerpos contra el receptor de acetilcolina (Marx y col., 2013; Zuckerman y col., 2010).

Los pacientes con miastenia gravis desarrollan en un 65% hiperplasia tímica y el 12% de los pacientes desarrolla timomas, por lo que es habitual que se les realice una timectomía (Shelly y col., 2011). Este procedimiento en general tiene buenos resultados en los pacientes, ya que mejora los síntomas de la enfermedad pero en ningún caso la cura (Romi, 2011).

En el caso del LES los trastornos en el timo no han sido ampliamente reportados pero existe entre un 1,5 y 2% de estos pacientes que desarrollan timomas (Shelly y col., 2011) y en estos casos se recomienda realizar una timectomía como tratamiento. En algunos casos se ha descrito que la timectomía ha sido beneficiosa para los pacientes (Mackay and Smalley, 1966; Stevi y col., 2017), sin llegar a curar el LES, mientras que en otros casos los síntomas del lupus se mantienen después de la timectomía (Bozzolo y col., 2000). En cualquier caso, las interacciones celulares que ocurren en el timo y que pudiesen contribuir al desarrollo de la enfermedad no se han descrito aún.

En algunos modelos murinos de LES se ha observado el aumento de linfocitos B en el timo en comparación a animales que aún no desarrollan la enfermedad. En estos trabajos se han enfocado en estudiar la función de los linfocitos B del timo como célula presentadora de antígeno, en este sentido el trabajo de Xing y col. demuestra que los linfocitos B del timo de ratones lúpicos regulan la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ en el timo (Xing y col., 2017). Por otro lado el trabajo de Sato y col. sugiere que los linfocitos B del timo podrían activar a los linfocitos T CD4⁺ del timo, sin embargo estos experimentos se realizaron utilizando linfocitos B provenientes de la cavidad peritoneal y

no del timo, por lo tanto no demostraron el efecto de los linfocitos B tímicos sobre los linfocitos T CD4⁺ del timo, en este contexto sugieren que los linfocitos B provenientes de la cavidad peritoneal migrarían de manera aberrante al timo y activarían a los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos del timo (Ishikawa and Matsushima, 2007; Sato y col., 2004). Por lo tanto, la contribución de los linfocitos T y B del timo en el desarrollo de una respuesta humoral autoinmune no ha sido estudiada.

Modelos murinos de LES

Para estudiar el LES se han desarrollado modelos murinos que imitan varios aspectos de la enfermedad. Existen varios modelos murinos espontáneos de desarrollo de LES, entre los cuales los más estudiados son MRL/lpr, BXSB/Yaa y NZBWF1.

El modelo MRL/lpr tiene una mutación autosómica recesiva *lpr* (por *lymphoproliferation*) (*lpr*) y se caracteriza por generar linfadenopatía debido a la acumulación de linfocitos T y B en los ganglios. En este modelo los ratones producen altos niveles de autoanticuerpos circulantes contra antígenos nucleares (anti-ANA, anti-ADNmc, anti-ADNdh) y factor reumatoide, lo que resulta en la formación de una gran cantidad de complejos inmunes. En este modelo la autoinmunidad se desarrolla en ambos sexos.

El modelo BXSB/Yaa desarrolla hiperplasia de los órganos linfoides secundarios, glomerulonefritis mediada por complejos inmunes, anticuerpos anti-eritrocitos y anti-nucleares, entre otros. La enfermedad se produce en ambos sexos pero en los machos es

mas agresiva con una sobrevida de 5 meses, mientras que la sobrevida de las hembras es de 14 meses.

El modelo NZBWF1 proviene de la cruce de los ratones NZB (*New Zealand Black*) y NZW (*New Zealand White*) y es el modelo que más se asemeja a la enfermedad en humanos. La enfermedad se caracteriza por la producción de anticuerpos antinucleares (ANA) y el desarrollo de una glomerulonefritis fatal mediada por complejos inmunes. De igual manera que en el LES en humanos, donde la enfermedad se produce en un 90% en mujeres, en este modelo la enfermedad se desarrolla exclusivamente en las hembras (Perry y col., 2011). En este trabajo utilizamos el modelo NZBWF1, ya que replica más características del LES en humanos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El timo de ratones NZBWF1, modelo murino de lupus eritematoso sistémico, contiene linfocitos T efectores y linfocitos B funcionales que contribuyen a la respuesta autoinmune humoral.

2.2. Objetivo general

Estudiar la participación de los linfocitos T y B presentes en el timo en la respuesta humoral autoinmune en el modelo murino NZBWF1 de lupus eritematoso sistémico.

2.3. Objetivos específicos

2.3.1. Estudiar los cambios fenotípicos que se producen en las subpoblaciones de linfocitos T y B en el timo de ratones NZBWF1 durante la progresión del lupus.

2.3.2. Estudiar la respuesta humoral autoinmune en el timo de ratones lúpicos.

2.3.3. Evaluar *in vitro* la contribución de los linfocitos B presentes en el timo de ratones lúpicos en la diferenciación de los linfocitos T.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales

3.1.1. Animales

Ratones hembras (NZBxNZW)F1 (en adelante NZBWF1) y NZW se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Para los experimentos se utilizaron ratones NZBWF1 y ratones controles (NZWxBALB/c)F1 de 3-10 meses de edad. Evaluamos el grado de la enfermedad a través de la presencia de daño renal. Esto lo determinamos de manera semi-cuantitativa evaluando la cantidad de proteína en la orina utilizando tiras reactivas Combur Test N (Roche Diagnostics, Alemania). Los ratones que presentaron proteinuria de 500 mg/dL durante 3 semanas consecutivas fueron sacrificados y estos ratones conforman el grupo de los ratones lúpicos. Además evaluamos mediante un ensayo convencional de ELISA anticuerpos anti-ADNdh en el suero de los ratones.

Para estudiar animales previo al desarrollo de la enfermedad se utilizaron ratones NZBWF1 de 3 y 5 meses de edad, denominados ratones prelúpicos ya que no presentan signos de la enfermedad. Como controles se utilizaron ratones hembras de la cepa no-autoinmune (NZWxBALB/c)F1 los que presentan el mismo haplotipo H-2 que los ratones NZBWF1.

Los ratones se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad, con aire filtrado y comida LabDiet®, en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida (Santiago, Chile). Los

animales fueron sacrificados mediante la exposición a dióxido de carbono. Este trabajo se encuentra en acuerdo con las normas de bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y de la Fundación Ciencia & Vida.

3.1.2. Anticuerpos

Anticuerpos monoclonales específicos para ratón adquiridos en BioLegend (San Diego, CA): CD4 PE (clon RM4-5), CD4 PECy7 (clon GK1.5), CD5 PeCy7 (clon 53-7.3), CD8 FITC (clon 53-6,7), CD11c FITC (clon N418), CD19 FITC (clon 6D5), CD40 (clon 3/23) CD44 APC (clon IM7), CD69 PE (clon H1.2F3), CD83 APC (clon Michel-19), CD86 FITC (clon GL1), CD138 PE (clon 281-2), CD138 BV421 (clon 281-2), CD45R/B220 APC (clon RA3-6B2), CXCR3 (clon CXCR3-173, IgG-HRP (policlonal), IgM PeCy7 (clon RMM-1), IgM Biotina (clon RMM-1), Ki-67 Alexa fluor 488 (clon 11F6), CXCR5 PE (clon L138D7) .

Anticuerpos monoclonales específicos para ratón adquiridos en eBioscience (San Diego, CA): CD4 efluor570 (clon RM4-5), CD8 APC efluor 780 (clon 53-6.7), CD11c PE (clon N418), CD16/32 (clon 93), CD19 APC (clon 1D3), CD19 APC-eFluor 780 (clon 1D3), CD25 APC (clon PC61.5), CD40 APC (clon 1C10), CD62L FITC (clon MEL-14), CD103 FITC (clon 2E 7), GL7 efluor 660 (clon GL7), I-Ad APC (clon AMS-32.1), IgD FITC (clon 11-26c), IgM purificado (clon II/41) CCR9 APC (clon CW1.2), PD1 FITC (clon J43),

Anticuerpos monoclonales específicos para ratón adquiridos en BD Pharmingen (San Diego, CA): I-Ad FITC (clon AMS-32.1), I-Ad purificado (clon 34-5-3), CD79b FITC (clon HM79b).

Para determinar viabilidad se utilizó Fixable Viability Dye eFluor® 780 (eBioscience) y yoduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich, USA).

Otros: IgG (policlonal, Invitrogen), IgG biotina (policlonal, Invitrogen).

3.1.3. Reactivos

Citometría de flujo: Yoduro de propidio (Sigma), kit para la tinción de Foxp3 (eBioscience cat. 005521).

Cultivo celular: Medio de cultivo RPMI-1640, tripsina-EDTA, L-glutamina, penicilina, estreptomicina, B-mercaptoetanol (Gibco cat. 21985), fungizona (Gibco cat. 15290). *CellTrace^(T) Violet* (Invitrogen), proteína recombinante IL-7 (eBioscience cat. 14-8071).

ELISA/ELISpot: Placa 96 pocillos de fondo plano (Nalgene Nunc International, USA), Placas para ELISpot (Millipore® MAIPS4510), ADN de timo de cabra (SIGMA, USA) Tween 20 (Sigma-Aldrich), kit TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences cat. 555214), Avidina-HRP (eBioscience 18-4100), ELISA Diluent Solution (eBioscience cat. 00-4202).

Inmunofluorescencia de tejido: Agarosa Ultrapure (Invitrogen cat. 16520), 2-metilbutano (Sigma cat. M32631), O.C.T. Compound Tissue-TEK®, (ProLong Gold antifade Invitrogen cat. P36934), BSA (Sigma), Millicel cell culture insert (Millipore cat. 1002348281)

Generales: RBC lysis buffer (Biolegend cat.420301), agua bidestilada Sanderson.

3.1.4. Equipos

Cell sorter BD FACSAria™ III, BD Biosciences, California USA (UChile)

Cell sorter BD FACSAria™ III, BD Biosciences, California USA (FCV)

Citómetro de flujo FACSCanto II, BD Biosciences, California USA

Emax Precision Microplate Reader, Molecular Devices, USA

Centrífuga 5804 R, Eppendorf

Centrífuga 5402 R, Eppendorf

Incubador de CO₂ Serie 8000 WJ, Thermo Scientific, USA

Microscopio Óptico Labophot-2, Nikon, USA

Microscopio confocal Zeiss LSM 710

Vibrátomo Pelco® 102

Criostato MICROM HM 525

Escáner de ELISpot AELVIS

3.1.5. Programas

BD FACSDiva v.6.1.3, BD Biosciences, California USA

FlowJo v8.8.6 32bit para Macintosh, Tree Star, Inc., Trustees of Leland Stanford, Oregon
USA

SOFTmaxPRO v.4.0, Life Sciences Edition, USA

GraphPad Prism 6 para Mac OSX, GraphPad Software, San Diego California USA

AELVIS Software Automater Elisa-spot Assay Video Analysis Systems

ImageJ

3.2. Métodos

3.2.1. Obtención de suero a partir de sangre de ratones

Se obtuvo sangre a partir de la vena lateral de la cola de ratones. Para esto se calentó la cola del animal bajo una lámpara y mediante el uso de un bisturí se realizó una pequeña incisión a un lado de la cola. La sangre se mantuvo por 18 h a 4°C. Luego se obtuvo el suero, para esto se centrifugó a 500 x g por 7 min a 4°C para eliminar restos de eritrocitos. Los sueros fueron guardados a -20°C hasta su posterior utilización para ensayos de ELISA.

3.2.2. Elisa para la detección de anticuerpos anti-DNA de doble hebra

Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nalgene Nunc) recubiertas con 65 ng de ADN de timo de cabra (SIGMA, USA) disuelto en 100 µL de buffer SSC (NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M pH 8) por pozo. Se incubaron por 18 h a 37°C y se lavó una vez con PBS-Tween 0,05%. Luego, las placas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con PBS-Tween 0,05% y se lavaron tres veces con una solución de PBS-Tween 0,05%. Posteriormente se agregaron los sueros de los ratones (Métodos 3.2.1) diluidos 1/250 en PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Luego las

placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra y conjugado a HRP (Biolegend) diluido 1/4000 en PBS-Tween 0,05%. Por último, las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100 µL por pozo del sustrato proveniente del kit TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences). La reacción se detuvo usando 50 µl por pozo de una solución 1M de H₃PO₄ (Merk) y se leyeron las densidades ópticas a 450 nm en un lector de placas (Molecular Devices).

3.2.3. Aislamiento de células de timo, bazo y médula ósea.

Se disectó el timo y el bazo de los animales, los que se disgregaron mecánicamente en 500 µl de RPMI + 10% FBS. La suspensión celular se filtró en una malla metálica de 90 µm y se completó el volumen a 10 mL con RPMI + 10% FBS. Las células se centrifugaron a 600 x g por 7 min a 4°C y el pellet se resuspendió en RPMI + 10% FBS en el caso del timo. En las células del bazo se lisaron los glóbulos rojos agregando 2 mL de solución de lisis para glóbulos rojos (RBC lysis buffer, Biolegend), se incubaron 5 min en hielo, luego se detuvo la lisis completando el volumen a 10 mL con RPMI + 10% FBS, luego las células se centrifugaron a 600 x g por 7 min a 4°C y el pellet se resuspendió en RPMI + 10% FBS. Las células se contaron con cámara de Neubauer. Posteriormente, las células se utilizaron para análisis por citometría de flujo o para seleccionar alguna población por *cell sorting*. Para obtener las células de la médula ósea se obtuvieron los huesos del fémur y tibia, se sacó la médula ósea pasando RPMI con una jeringa y aguja de 28G por el interior de los

huesos, las células se disgregaron mediante agitación mecánica, se filtraron por malla de 90 µm metálica y se procedió a lisar los glóbulos rojos y recuento celular como en el caso del bazo.

3.2.4. Citometría de flujo para marcadores de superficie en linfocitos provenientes de órganos linfoides.

Las células en suspensión obtenidas de los distintos órganos (Métodos 3.2.3) se incubaron en 100 µl de PBS + 2% FBS con el anticuerpo bloqueador de receptores Fc a-CD16/32, a una concentración de 1,25 µg/mL por 10 min a 4°C. Luego se agregaron las correspondientes combinaciones de anticuerpos diluidos en PBS + 2% FBS durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Posteriormente se lavaron los anticuerpos agregando 1 mL de PBS + 2% FBS y centrifugando a 600 x g por 7 min a 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300-500 µl de PBS + 2% FBS para analizarlas en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, USA). Las células muertas fueron descartadas utilizando yoduro de propidio a 1 µg/mL por cada 2×10^6 células (Sigma Aldrich, USA). Los análisis de los datos se realizaron utilizando los programas FACS Diva y FlowJo.

3.2.5. Citometría de flujo para la detección intracelular de Ki-67

Una vez realizado el marcaje de superficie (Métodos 3.2.4.) las células se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 células/mL en 300 µL de la solución de

fijación/permeabilización del kit para la tinción de Foxp3 (eBioscience) por 30 min a 4°C y oscuridad. Luego las células se lavaron con 700 µL de buffer de permeabilización y se centrifugaron a 720 x g por 8 minutos a 4°C. Se agregó a cada tubo el anticuerpo anti-Ki-67 (Biolegend) a 1,25 µg/mL diluido en buffer de permeabilización. Se incubó por 30 minutos en oscuridad a 4°C, las células se lavaron con 700 µL del buffer de permeabilización y se centrifugaron a 720 x g por 8 minutos. Finalmente se resuspendieron en PBS + 2% FBS para posteriormente ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, USA). Para descartar células muertas del análisis se utilizó el reactivo Fixable Viability Dye eFluor® 780 (eBioscience) (1 µL/mL). Los análisis de los datos se realizaron utilizando los programas FACS Diva y FlowJo.

3.2.6. Cocultivo de linfocitos B de timo con timocitos

Los linfocitos B de timo de ratones controles y lúpicos fueron aislados mediante la técnica de *cell sorting*. Para obtener linfocitos B de timo de ratones controles fue necesario utilizar 5 ratones (NZWxBALB/c) F1, mientras que para obtener linfocitos B timo de ratón lúpico fue necesario 1 ratón, estos animales tenían la misma edad.

Las células fueron obtenidas mediante el protocolo (Métodos 3.2.3) y se tiñeron con anticuerpos para seleccionar linfocitos B, para esto se dejaron a una concentración de 100×10^6 células/mL y se continuó con el protocolo (Métodos 3.2.4) el marcaje se realizó con a-CD19, a-CD5 y a-CD11c . Para el *cell sorter* las células se resuspendieron en RPMI + 10% FBS y se pasaron a una velocidad de 8.000 eventos/seg aprox. Después del

sorter las células se centrifugaron a 700 x g por 9 min a 4°C y se resuspendieron en RPMI + 10% FBS. Luego las células se esterilizaron con medio RPMI + 10% FBS suplementado con antibióticos (300 U/mL penicilina + 0,3 mg/mL estreptomicina) por 3 min a temperatura ambiente, se lavaron las células agregando 5 veces el volumen de antibióticos con RPMI + 10% FBS y centrifugando a 700 x g por 9 min a 4°C. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio de cocultivo RPMI + 10% FBS + B-mercaptoetanol (Gibco) 0,055 μ M + fungizona (Gibco) 0,5 μ g/mL. Finalmente, las células se contaron con cámara de Neubauer, se ajustaron a una concentración de 1×10^5 linfocitos B/mL y se pusieron 100 μ l (1×10^4 células) de linfocitos B en placa de 96 pocillos con fondo redondo.

Como células respondedoras se utilizaron timocitos de un ratón control (NZWxBALB/c) F1 de 2 meses de edad, se disectó el timo y se les eliminó las células presentadoras de antígenos. Para esto se agregó 1 μ L del anticuerpo I-Ad no marcado por cada 1×10^7 células y se incubó durante 15 minutos a 4°C en agitación suave. Luego, las células se lavaron con buffer de purificación (PBS, EDTA 2mM, 0,5% FBS) a 600 x g por 7 minutos. Posteriormente las células se resuspendieron en 80 μ L de buffer de purificación por cada 1×10^7 células y se incubaron con 20 μ L de MACS anti-IgG de ratón (Miltenyi Biotec) durante 20 minutos a 4°C en agitación suave. Finalmente las células se lavaron con buffer de purificación, se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos y se seleccionaron negativamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec). En algunos casos este proceso se realizó por

cell sorting y para ellos se tiñieron los timocitos con I-Ad marcado en APC y se seleccionaron las células negativas para I-Ad en el equipo *Cell sorter* BD FACSAria™ III. Una vez obtenidas las células se esterilizaron de la misma manera que se realizó con los linfocitos B y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 timocitos/mL, se agregó IL-7 a una concentración de 6 ng/mL y se pusieron la placa 100 μ L de timocitos (1×10^5 células).

El cocultivo se mantuvo durante 5 días a 37°C y 5% CO₂. Posterior a esto las células se recuperaron y se analizó la población de linfocitos T foliculares, mediante citometría de flujo.

3.2.7. Cocultivo de linfocitos T foliculares con linfocitos B de timo

Los linfocitos T foliculares y linfocitos B de timo y bazo de ratones lúpicos fueron aislados mediante la técnica de *cell sorting*. Una vez obtenida la suspensión celular (Métodos 3.2.3), las células se tiñeron con CD4, CD8, PD1, CXCR5, CD19 y CD5. Con este marcaje se seleccionaron, en el equipo *Cell sorter* BD FACSAria™ III, linfocitos T foliculares (CD4⁺CD8⁻PD1⁺CXCR5⁺) y linfocitos B (CD19⁺CD5^{-/int}). Como control de los linfocitos T foliculares se seleccionó la población no folicular (CD4⁺CD8⁻PD1⁻CXCR5⁻). Posteriormente, las células se esterilizaron con medio RPMI + 10% FBS suplementado con antibióticos (300 U/mL penicilina + 0,3mg/mL estreptomina) por 3 min a temperatura ambiente, las células se lavaron agregando 5 veces el volumen de antibióticos con RPMI + 10% FBS y centrifugando a 700 x g por 9 min a 4°C. Los linfocitos B se tiñeron con *CellTrace*^(T) Violet (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante.

Finalmente, los linfocitos B se ajustaron a una concentración de 5×10^5 células/mL y los linfocitos T foliculares a una concentración de 1×10^5 células/mL, se pusieron en cultivo 100 μ l de cada tipo celular (50.000 linfocitos B y 10.000 de linfocitos T foliculares).

Como control positivo de activación de los linfocitos B se agregaron las citoquinas IL-21 a 50 ng/mL y α -CD40 a 1 μ g/mL (Biolegend)

El cocultivo se mantuvo durante 5 días a 37°C y 5% CO₂. Posterior a esto las células se recuperaron y se analizaron los linfocitos B en relación a la proliferación y a la activación mediante GL7 que es un marcador de linfocitos B activados que forman un centro germinal (Naito y col., 2007). Este análisis se realizó por citometría de flujo.

3.2.8. ELISpot

Se determinó el número de células secretoras de anticuerpos IgG e IgM total y contra ADN-dh mediante ELISpot. Para esto, inicialmente se activó la placa Millipore® MAIPS4510 de 96 pocillos con etanol 70% (50 μ L por 2 min) y se lavó 5 veces con agua desionizada. Para evaluar reactividad contra ADN se trató la placa con 10 μ g/mL de metil-BSA por 3 h a 37°C. Luego se agregaron 100 μ L/pocillo de anticuerpo de captura IgG o IgM a 15 μ g/mL en PBS o bien 10 μ g/mL de ADN-dh y se incubaron a 4°C por 16 h sobre papel absorbente húmedo. Posteriormente, las placas se lavaron y se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente con 200 μ L/pocillo de medio RPMI + 10% FBS.

Se obtuvieron suspensiones celulares de timo, bazo y médula ósea de ratones controles viejos y lúpicos mediante el protocolo (Métodos 3.2.3) y se agregaron a la placa

en un volumen de 200 μ L a diferentes densidades para obtener un número adecuado de spots.

Luego de 20 h de incubación a 37°C, CO₂ 5%, las placas se lavaron 5 veces con PBS, luego de lo cual se agregaron 100 μ L/pocillo de anticuerpo de detección policlonal goat anti mouse IgG biotinilado o anti mouse IgM biotinilado (clone RMM-1) a 0,5 μ g/mL en PBS + 0,5% FBS y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Luego las placas se lavaron 5 veces con PBS y se agregaron 100 μ L/pocillo de la enzima avidina conjugada a HRP (eBioscience) diluida 1:500 según las indicaciones del fabricante y se incubó por 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, las placas se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron con 100 μ L/pocillo de la solución con el sustrato final (3-amino-9-etilcarbazol + H₂O₂) en ausencia de luz. Las placas se lavaron con agua bidestilada y se dejaron secar destapadas durante 3 h a 37°C. Finalmente, se determinó el número de spots utilizando el lector de ELISpot AELVIS y el software Eli.Analyse ELISpot Analysis Software V6.0.

3.2.9. Inmunofluorescencia de tejido congelado

Se disectó el timo y se embebió en PBS + 20% O.C.T. Compound Tissue-TEK® por 5 min a temperatura ambiente, luego el órgano se pasó a O.C.T. Compound Tissue-TEK® en un pocillo para congelación y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, después el tejido se congeló utilizando 2-metilbutano (Sigma) con hielo seco y se almacenó a -80°C. Este tejido después de al menos 2 días se cortó en el criostato MICROM HM 525 y se

obtuvieron cortes de 12 μm que fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la inmunofluorescencia el tejido se dejó secar a temperatura ambiente por 30 min y se fijó con una mezcla de etanol:acetona 1:1 fría por 20 min a temperatura ambiente, luego el tejido se secó a temperatura ambiente por 5 min, se lavó 2 veces con PBS por 5 min y a continuación se bloqueó con PBS + 10% FBS de rata por 1 h a temperatura ambiente. Para eliminar la solución de bloqueo se realizaron 3 lavados con PBS por 10 min cada uno. Luego se agregaron los anticuerpos diluidos en PBS + 1% BSA, se agregaron 50 μL de la mezcla de anticuerpos por tejido aprox. Los tejidos se incubaron toda la noche a 4°C , posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS. Finalmente se procedió al montaje, se agregaron dos gotas de medio de montaje ProLong Gold antifade (Invitrogen) a los tejidos y se cubrió con un cubreobjeto. Se analizó en el microscopio confocal Zeiss LSM 710 y las imágenes se analizaron con ImageJ.

3.2.10. Inmunofluorescencia de rebanadas de tejido

Para algunas microscopías se utilizaron rebanadas de tejido, para esto se obtuvo el timo de los animales y se embebieron en una solución de RPMI + 10% FBS + 5% agarosa de bajo punto de fusión (Invitrogen) tibia, esta solución se mezcló previamente y se homogeneizó mediante calor. Una vez que se solidificó el agar, se cortaron rebanadas de 400 μm en el vibrátomo PELCO® 102. Una vez obtenidas las rebanadas se fijaron con paraformaldehído 3,7% pH 7 por 20 min a temperatura ambiente. Después de la fijación se tiñeron las rebanadas con los anticuerpos. Para esto se utilizaron placas de 6 pocillos,

en los que se agregó 1 mL de PBS a cada pocillo, se puso un filtro Millicel cell culture insert (Millipore) previamente embebido en PBS y se agregó una rebanada de tejido, esta rebanada se mantuvo fija al filtro mediante un anillo metálico para evitar movimientos. Luego se agregó el mix de anticuerpos en 20 μ L de PBS (1,5 μ L de CD4 PE y CD8 FITC y 1 μ L de CD19 APC y CD138 BV421) y se incubó por 30 min a 37°C, posteriormente se lavó con 1 mL de PBS 3 veces. Finalmente se puso la rebanada en un portaobjeto con medio de montaje ProLong Gold antifade (Invitrogen) y se cubrió con un cubreobjeto. Se analizó en el microscopio confocal Zeiss LSM 710 y las imágenes se analizaron con ImageJ.

3.2.11. Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Graph Pad Prism program v6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos entre ratones controles, prelúpicos y lúpicos fueron comparados de a pares utilizando un t-test no pareado tras la verificación de que los datos siguieran una distribución normal. Cuando los datos no siguieron una distribución normal se utilizó un t-test no pareado no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas. Todos los análisis se realizaron con intervalos de confianza de 95%. Los valores de probabilidad (p) menores a 0,05 se consideraron significativos, las significancias se determinaron según los valores de P , no significativo (ns): $P > 0.05$, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$

4. RESULTADOS

4.1. Alteraciones en el timo durante el desarrollo del lupus.

El timo es un órgano linfoide primario donde se seleccionan los linfocitos T que circularán en el organismo. La pérdida de celularidad en el timo con la edad es un proceso ya descrito que se conoce como involución tímica (Linton and Dorshkind, 2004; Palmer, 2013; Prelog, 2006). En la figura 1A se observa que animales enfermos de lupus poseen timos con una celularidad significativamente reducida comparado a la celularidad de los timos de ratones controles y prelúpicos. Además se puede observar que la reducción de la celularidad del timo a lo largo de la edad es más drástica en los ratones que desarrollan la enfermedad, comparada a los ratones controles. En la imagen de la figura 1B se muestra la reducción del tamaño del timo proveniente de un ratón enfermo comparado al timo de un ratón control. Considerando que los controles viejos tienen la misma edad que los ratones lúpicos, la figura 1 muestra que los ratones lúpicos tienen acelerado el proceso de involución tímica. Estudios realizados en ratones han descrito que la involución del timo afecta la tolerancia central lo que resulta en la liberación de linfocitos T autorreactivos que al emigrar del timo adquieren un fenotipo activado determinado por la expresión de CD44 (Coder y col., 2016). Por esta razón la involución tímica se ha descrito como un fenómeno responsable en parte del aumento en la susceptibilidad y severidad de infecciones, cáncer y enfermedades autoinmunes (Aw and Palmer, 2011).

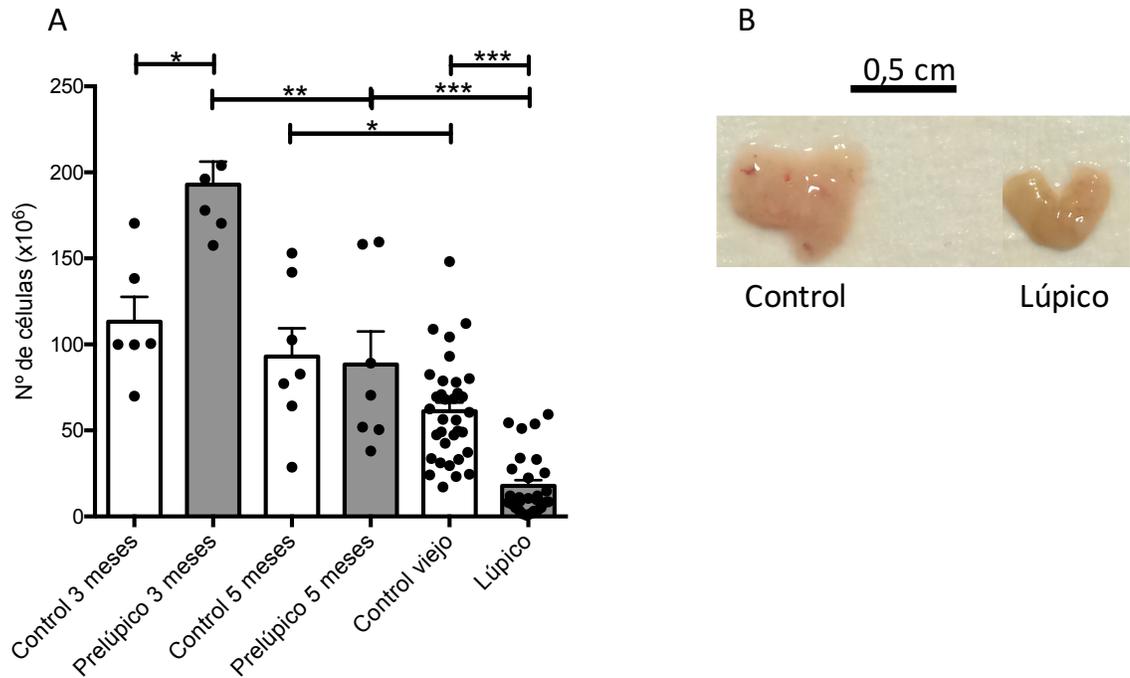


Figura 1. **Ratones enfermos de lupus presentan baja celularidad en el timo.** (A) Cuantificación del número total de células obtenidas luego de la disgregación del timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. El recuento celular se obtuvo mediante microscopía. Cada punto representa un ratón. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: $P > 0.05$, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$. (B) Fotografía de timos obtenidos de ratones control viejo y lúpico como ejemplo de las diferencias de tamaño.

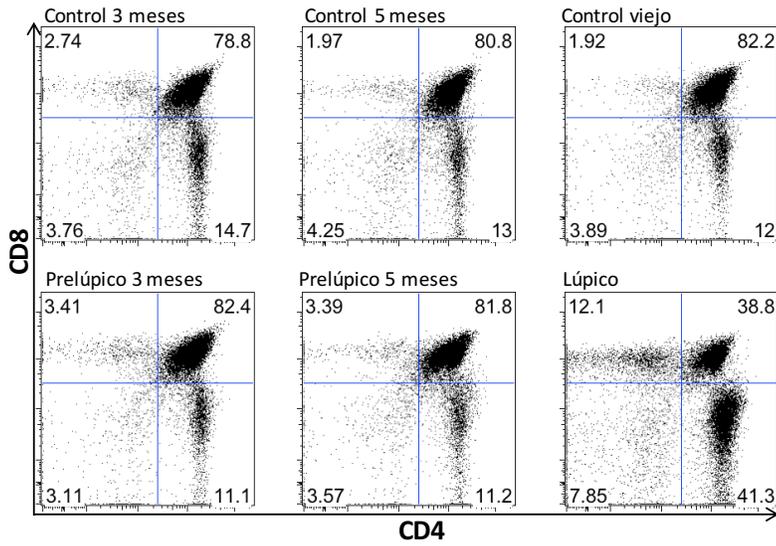
4.2. Homeostasis alterada de las subpoblaciones de timocitos durante el desarrollo del lupus.

Los timocitos son las células mayoritarias del timo en condiciones normales y dan origen a los linfocitos T que circularán por el organismo. Las subpoblaciones de timocitos presentes en el timo de los ratones lúpicos, prelúpicos y controles fueron analizadas

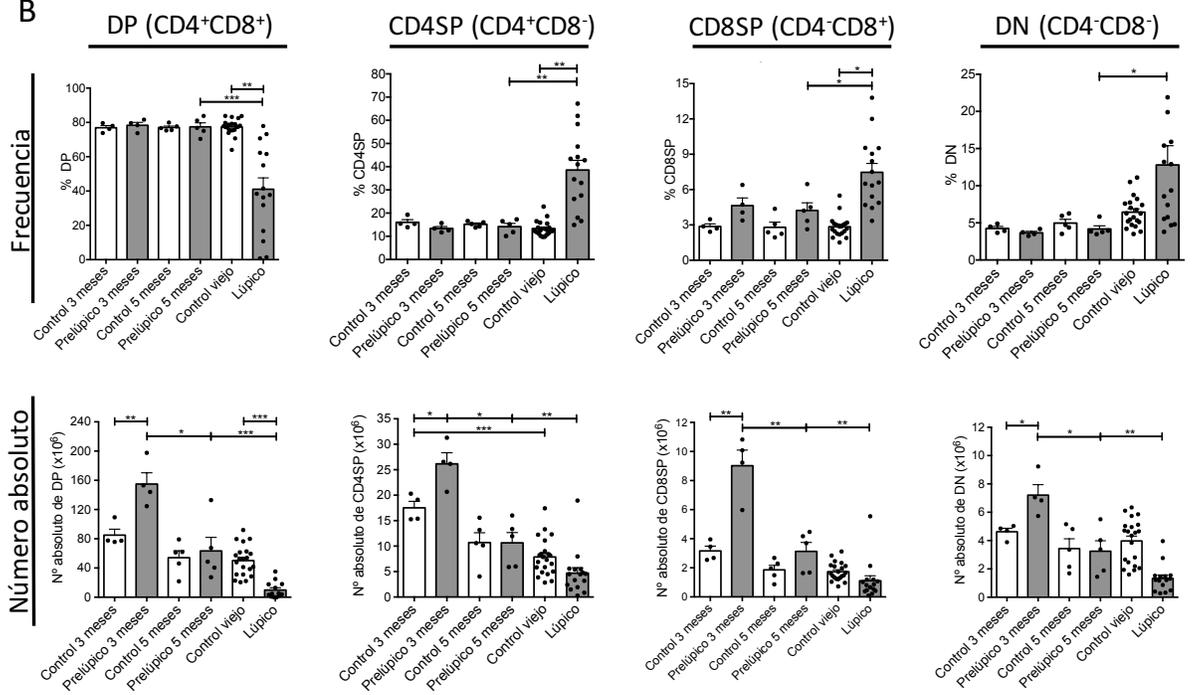
mediante citometría de flujo y microscopía confocal. En la figura 2A observamos que el timo del ratón lúpico presenta una reducción significativa de los timocitos doble positivos $CD4^+CD8^+$ comparado al timo de los ratones controles y prelúpicos. En consecuencia a esta reducción se observa un aumento en la frecuencia de los timocitos doble negativos $CD4^-CD8^-$, $CD4^+CD8^-$ (CD4SP, SP por *single positive*) y $CD4^-CD8^+$ (CD8SP) en el timo del ratón lúpico comparado a los ratones controles y prelúpicos. En la figura 2B, que muestra la cuantificación de los datos de la figura 2A, observamos que en el timo del ratón con predisposición a desarrollar lupus las frecuencias de las subpoblaciones de timocitos cambian una vez que el ratón presenta la enfermedad, ya que entre los 3 y 5 meses no hay diferencias en la frecuencia de las diferentes subpoblaciones de timocitos al compararlo con los ratones controles. En relación a los números absolutos, los ratones prelúpicos de 3 meses de edad presentan un mayor número en todas las subpoblaciones de timocitos comparado a ratones controles de la misma edad, sin embargo estos números absolutos disminuyen progresivamente a lo largo del tiempo.

Además evaluamos la distribución de los timocitos en cortes de timo mediante microscopía confocal, la figura 2C muestra que en el timo del ratón enfermo existe una pérdida de la estructura determinada por la corteza y la médula, comparada al timo del ratón control.

A



B



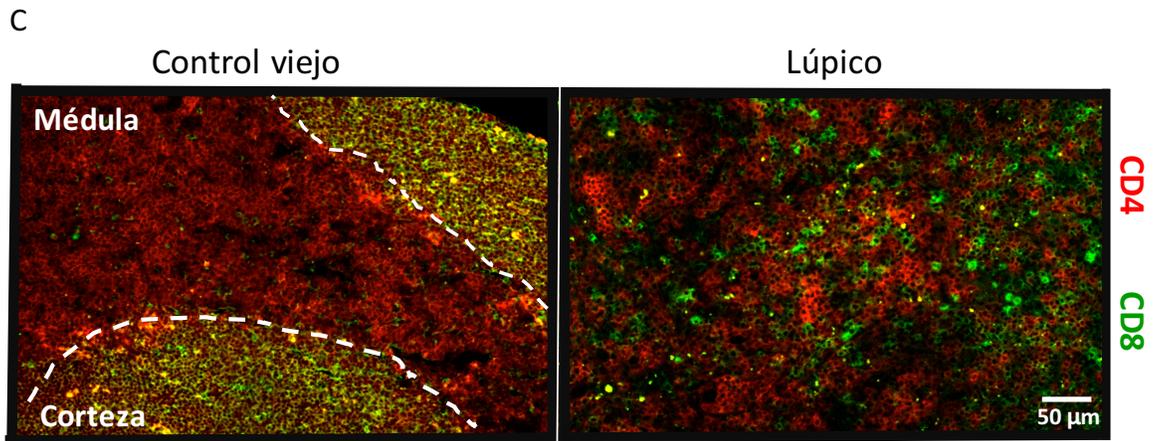


Figura 2. Las subpoblaciones de timocitos se encuentran alteradas en ratones enfermos de lupus. (A) Análisis de la población CD4 y CD8 en timo de ratones controles, prelúpico y lúpico, mediante citometría de flujo. El análisis fue realizado en una ventana I-Ad⁻, para eliminar las células presentadoras de antígenos. (B) Resumen de la frecuencia y número absoluto de las poblaciones de timocitos presentes en la parte A. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: P>0.05, *: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001. (C) Análisis de la población de células CD4 y CD8 en cortes de timo de ratones control viejo y lúpico, mediante microscopía confocal. Experimento representativo de 4 experimentos independientes.

4.3. El timo de ratones lúpicos tiene principalmente linfocitos T de memoria y efectores.

Dado que el timo de los ratones lúpicos presenta alteraciones importantes en las proporciones de las subpoblaciones de timocitos, analizamos el fenotipo de las células CD4SP. Estas células, durante su desarrollo, pasan por distintos estados de maduración que se caracterizan inicialmente por una baja expresión de CD62L y una alta expresión de CD69, lo que las define como células CD4SP inmadura. Luego el aumento de CD62L y la disminución de CD69 las define como células CD4SP maduras capaces de migrar fuera del

timo. Una vez que la célula CD4SP sale a la circulación lo llamamos linfocito T CD4⁺ vírgen ya que aún no ha interactuado con el antígeno que lo diferenciará a un linfocito T efector o de memoria (Alfonso y col., 2006; Weinreich and Hogquist, 2008). El linfocito T efector o de memoria se caracteriza además por una alta expresión de la molécula CD44. La figura 3 muestra que el timo de ratones controles o prelúpicos contiene mayoritariamente células CD4SP inmaduras (50% aprox.) y una menor proporción de células CD4SP maduras (30% aprox.), mientras que en los ratones lúpicos ambas poblaciones se encuentran significativamente reducidas (25% aprox. las células CD4SP inmaduras y 12% aprox. las células CD4SP maduras). Al parecer, la función de exportar linfocitos T CD4⁺ a la circulación desde el timo se encuentra alterada en ratones enfermos.

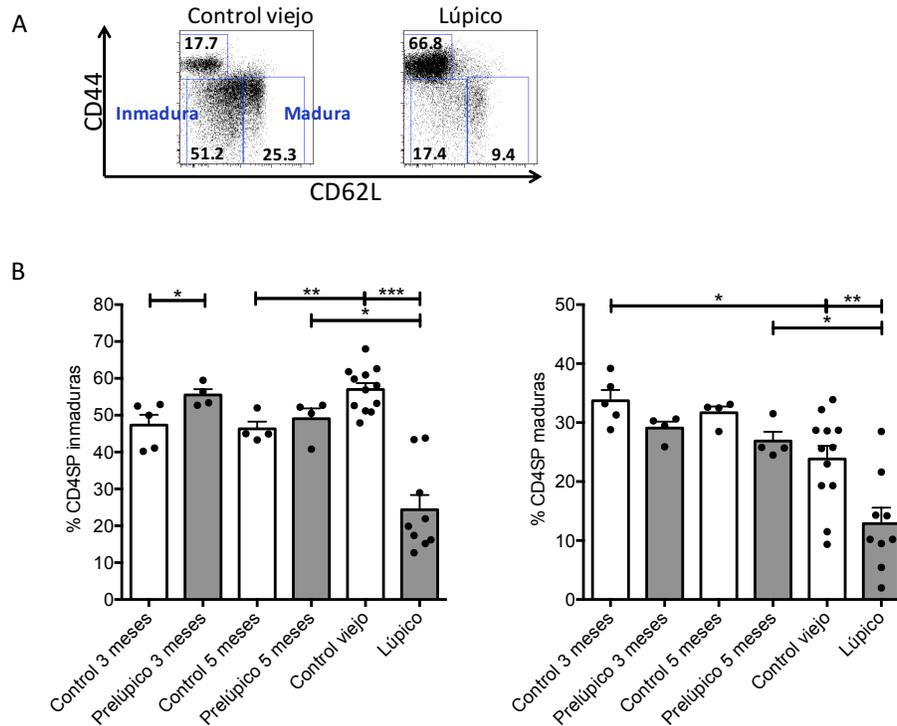


Figura 3. La población CD4SP madura e inmadura se encuentra reducida en el timo de ratones enfermos de lupus. Análisis de la población CD4SP inmadura ($CD4^+CD62L^{baja}CD44^{bajo}$) y CD4SP madura ($CD4^+CD62L^{alta}CD44^{bajo}$) en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos, mediante citometría de flujo. (A) Ejemplo representativo de la expresión de CD44 y CD62L en una ventana de células CD4SP ($CD4^+CD8^-$). (B) Resumen de la frecuencia de la población CD4SP inmadura (izquierda) y madura (derecha). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: $P>0.05$, *: $P\leq 0.05$, **: $P\leq 0.01$, ***: $P\leq 0.001$.

En la figura 3A se puede observar que una alta proporción de células CD4SP del timo del ratón lúpico (66,8% vs 17,7% en el ratón control) expresan la molécula de adhesión CD44 que se regula positivamente después de la activación de linfocitos T vírgenes. Una vez que la infección es eliminada CD44 permanece expresado en los

linfocitos T de memoria que se definen como $CD44^+CD25^-$ (Baaten y col., 2010; Gossel y col., 2017). En la figura 4A y 4B (izquierda) analizamos la población de memoria en el timo de los ratones lúpicos, controles y prelúpicos. Estos resultados muestran que las células $CD4SP$ presentes en el timo del ratón lúpico se componen mayoritariamente de linfocitos T $CD4^+$ de memoria (55% aprox. vs 18% aprox. en el ratón control). En números absolutos existe un aumento significativo en los linfocitos T $CD4^+$ de memoria del timo de ratones lúpicos comparado a ratones controles viejos (figura 4B derecha).

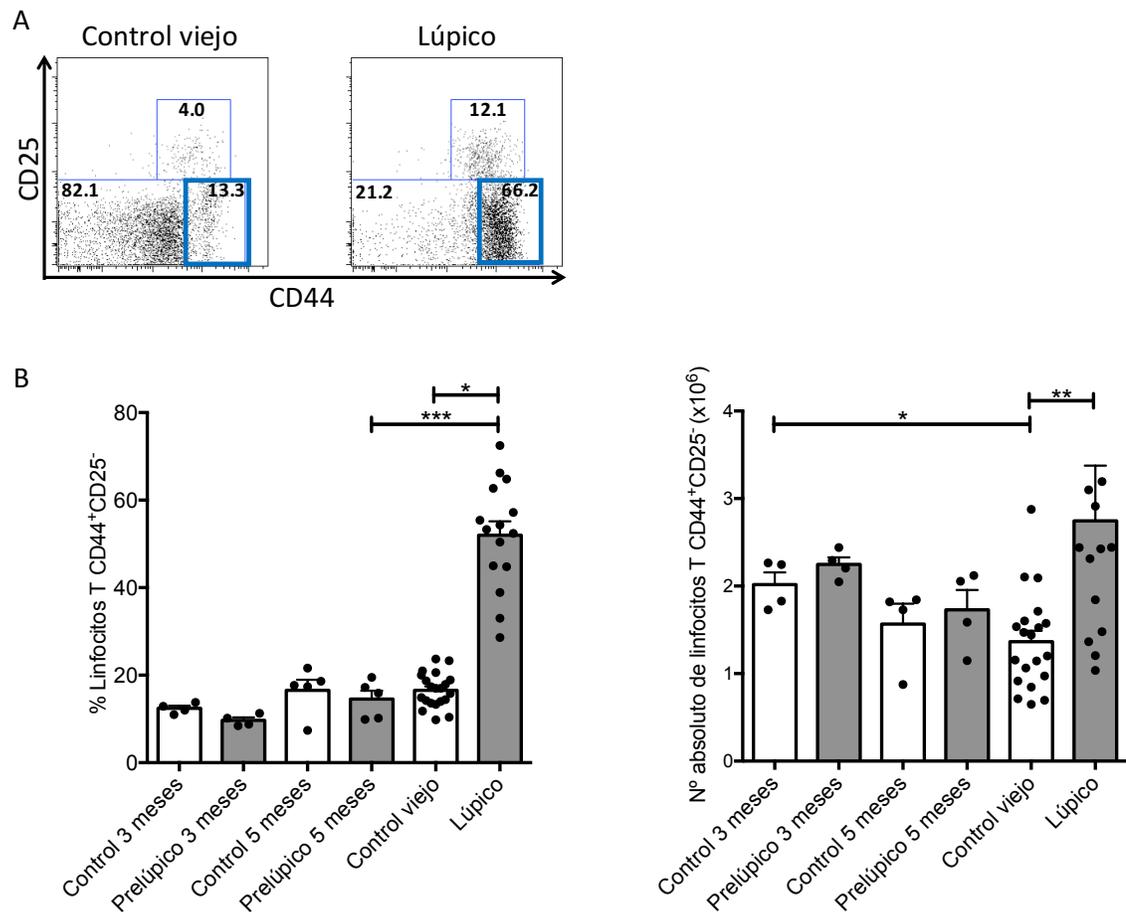


Figura 4. La población de linfocitos T $CD4^+$ de memoria se encuentra aumentada en el timo en ratones enfermos de lupus. Análisis de la población $CD4^+CD44^+CD25^-$ en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos, mediante citometría de flujo. (A) Ejemplo

representativo de la expresión de CD44 y CD25 en las células CD4SP (CD4⁺CD8⁻) provenientes de timo de ratones control viejo y lúpico. (B) Resumen de la frecuencia de la población de linfocitos T de memoria (derecha) y del número absoluto (derecha). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: P>0.05, *: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001.

Dentro de la población de linfocitos T de memoria se ha descrito una subpoblación como residente de tejido caracterizada por la expresión de CD103 y CD69, estos linfocitos T de memoria permanecen en el tejido y no recirculan por el organismo. Otra población de linfocitos T de memoria residentes de tejido pero con capacidad de recircular, son los linfocitos T que expresan CD103, pero no expresan CD69, los cuales se han reportado como células que se encuentran en estado de reposo (Bromley y col, 2013; Shin and Akiko, 2013; Wilk y col., 2017). En la figura 5A (izquierda) se observa que todas las células CD103⁺ son CD44⁺, confirmando que es una población de memoria. Luego la figura 5A (derecha) muestra el análisis de las poblaciones residente de memoria con capacidad de recircular (CD103⁺CD69⁻) y residente de tejido que no recirculan (CD103⁺CD69⁺) en el timo de ratones control viejo y lúpico. En la figura 5B se grafica el resumen de estos datos y se puede observar que la frecuencia de los linfocitos T de memoria residentes que pueden recircular no presentan diferencias entre los ratones controles viejos y lúpicos (figura 5B izquierda), sin embargo en números absolutos estas células se encuentran disminuidas en el ratón lúpico (figura 5C izquierda). Por otro lado, los linfocitos T de memoria residentes de tejido que no recirculan del timo se encuentran aumentados de manera significativa en frecuencia y en número absoluto en los ratones lúpicos comparado a los ratones controles viejos (figura 5B y 5C derecha).

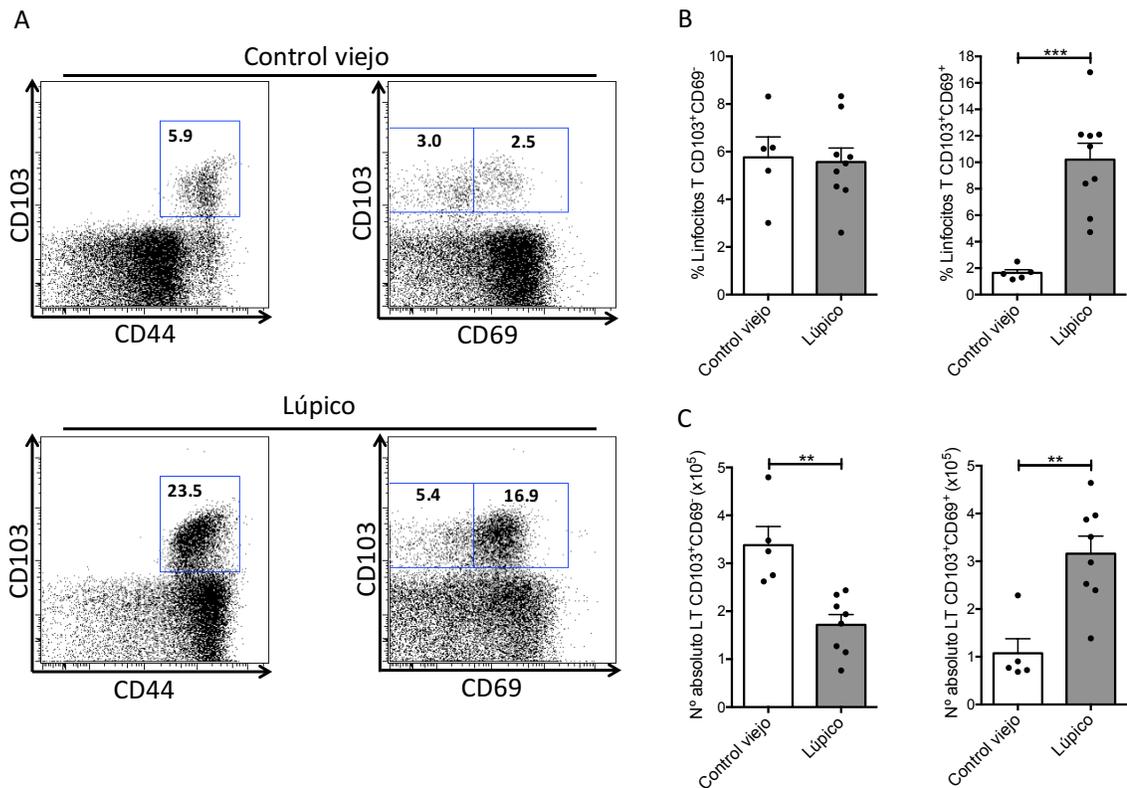


Figura 5. La población de linfocitos T CD4⁺ de memoria residente de tejido CD103⁺CD69⁺ se encuentra aumentada en el timo en ratones enfermos de lupus. Análisis de la población de linfocitos T de memoria residentes de tejido con capacidad de recircular (CD103⁺CD69⁻) y de linfocitos T de memoria residentes de tejido que no recirculan (CD103⁺CD69⁺). En (A) se muestra un ejemplo representativo de la expresión de CD103 y CD44 (izquierda) y la expresión de CD103 y CD69 (derecha) en las células CD4SP (CD4⁺CD8⁻) de timo de ratones control y lúpico. Resumen de la frecuencia (B) y de los números absolutos (C) de la población de linfocitos T de memoria residentes de tejido CD103⁺CD69⁻ (izquierda) y CD103⁺CD69⁺ (derecha). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: P>0.05, *: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001.

Por otra parte, PD1 y CXCR5 son dos moléculas que determinan que los linfocitos T se diferencien específicamente a linfocitos T foliculares. Los linfocitos T foliculares entregan señales de ayuda a los linfocitos B, a través de la interacción célula a célula y por señales mediadas por citoquinas. En respuesta a estas señales los linfocitos B se activan y

se diferencian a células plasmáticas (células secretoras de anticuerpos). En la figura 6 se puede observar que la población de linfocitos T foliculares se encuentra aumentada en el timo de ratones lúpicos comparado a ratones controles y prelúpicos. Este aumento se refleja tanto en la frecuencia como en el número absoluto de linfocitos T foliculares (figura 6B). Interesantemente, en los animales analizados a los 5 meses de edad hay un leve aumento en la frecuencia y en el número absoluto de los linfocitos T foliculares del timo en ratones prelúpicos de 5 meses comparado al control de su misma edad, indicando que el cambio en el fenotipo de las células CD4SP comienza previo a que se desencadene la enfermedad.

Los resultados obtenidos muestran que el timo de ratones lúpicos alberga principalmente linfocitos T CD4⁺ de memoria y una cantidad significativa de linfocitos T foliculares, en desmedro de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ en vías de diferenciación (células CD4SP inmaduras y maduras).

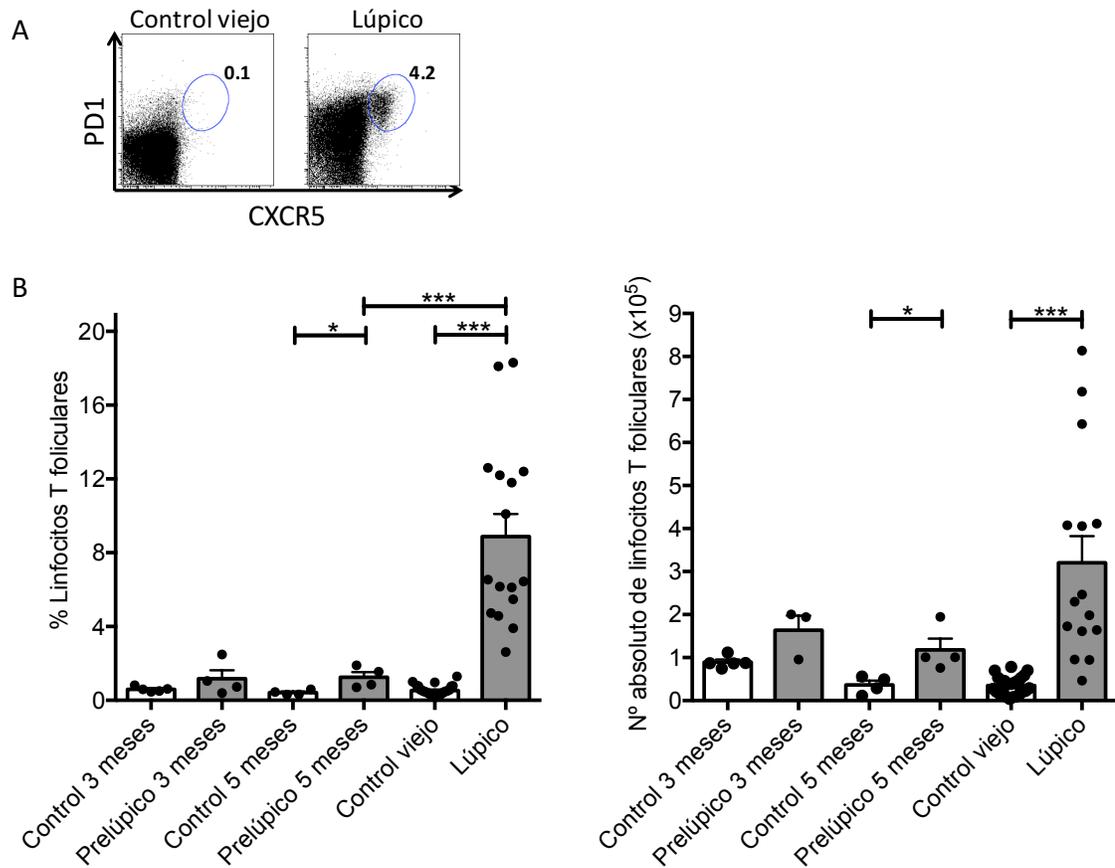


Figura 6. La población de linfocitos T foliculares se encuentra aumentada en el timo de ratones enfermos de lupus. Análisis de la población $CD4^+PD1^+CXCR5^+$ en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos, mediante citometría de flujo. (A) Ejemplo representativo de la expresión de PD1 y CXCR5 en una ventana de células $CD4SP$ ($CD4^+CD8^-$). (B) Resumen de la frecuencia de la población de linfocitos T foliculares (izquierda) y del número absoluto (derecha). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: $P > 0.05$, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$.

4.4. El timo de ratones lúpicos tiene aumentada la población de linfocitos B.

Trabajos ya publicados han demostrado que la presencia de linfocitos B en el timo es escasa (0,3% aprox. de las células del timo) y se les ha atribuido una función de célula

presentadora de antígenos relacionada con la selección de linfocitos T (Frommer and Waisman, 2010; Walters y col., 2014; Yamano y col., 2015). Sin embargo, recientemente hemos publicado un trabajo realizado en humanos en el que se le atribuye una nueva función al timo y es que, a lo largo de la edad, este órgano actuaría como un reservorio de linfocitos B y de células plasmáticas (Nuñez y col., 2016). La figura 7 muestra que los linfocitos B aumentan significativamente en frecuencia (de 0,5% a 20% aprox.) y en número absoluto (de $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 aprox.) en el timo de ratones lúpicos comparado a ratones controles y prelúpicos. Los ratones prelúpicos de 5 meses de edad presentan un leve aumento en la frecuencia de los linfocitos B comparado con los ratones controles de la misma edad y con los ratones prelúpicos de 3 meses de edad (figura 7B). Este resultado muestra que la frecuencia de los linfocitos B aumenta previo al desarrollo de la enfermedad, pero solo cuando se desarrolla la enfermedad los linfocitos B aumentan de manera excesiva en el timo.

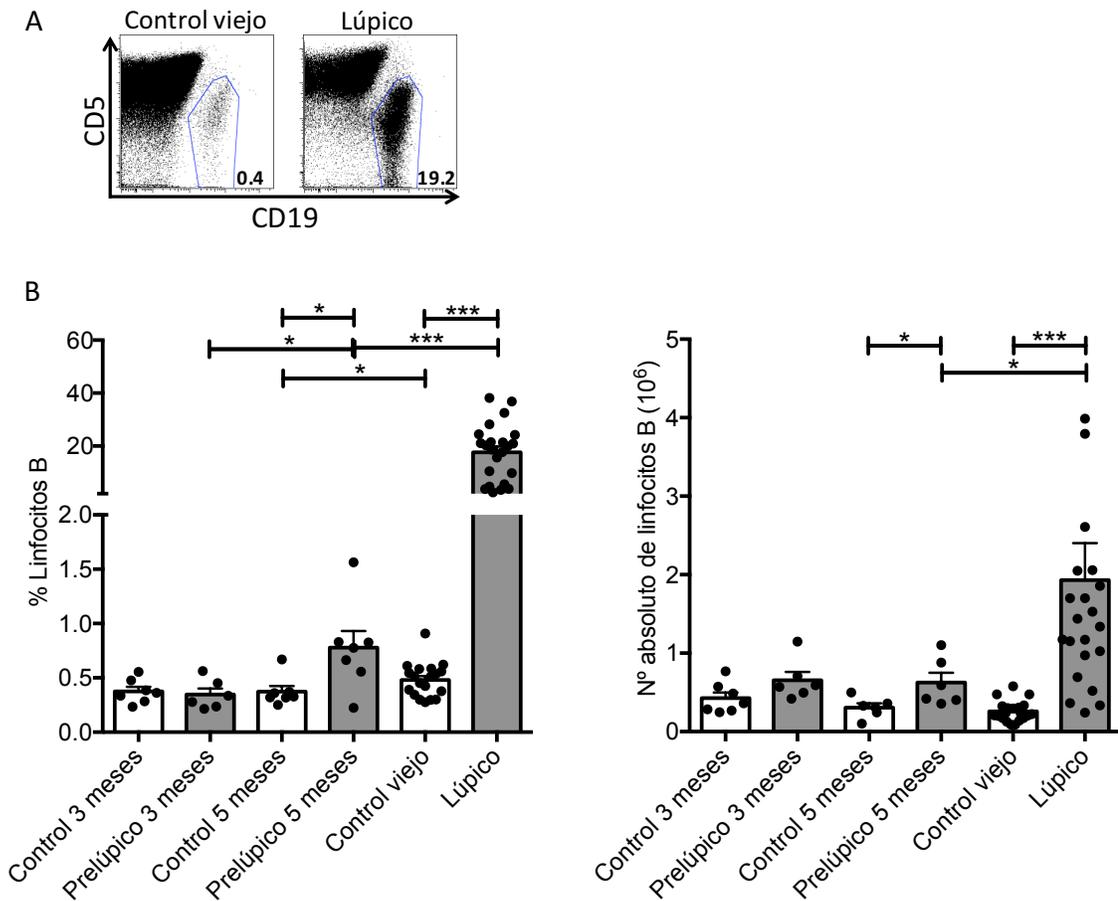


Figura 7. **Ratones enfermos de lupus presentan un aumento de linfocitos B en el timo.** Análisis de la población linfocitos B del timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos en el timo, mediante citometría de flujo. (A) Ejemplo representativo de la expresión de CD19 y CD5 en timo de ratones control viejo y lúpico. Para establecer la población de linfocitos B se utilizaron los anticuerpos a-CD19, a-CD5 y a-CD11c (la población de linfocitos B se determinó como $CD19^+CD11c^-CD5^{-int}$). (B) Resumen de la frecuencia de la población de linfocitos B (izquierda) y del número absoluto (derecha). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: $P > 0.05$, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$.

Dado que los linfocitos B pueden actuar como células presentadoras de antígenos (Perera y col., 2013; Walters y col., 2014; Yamano y col., 2015), evaluamos la expresión de moléculas de coestimulación y de presentación de antígenos (CD83, CD86, CD40 e I-

Ad) en los linfocitos B del timo. La figura 8 muestra que, con el n analizado, no existen diferencias significativas en la expresión de estas moléculas entre los linfocitos B del timo de ratones lúpicos y de ratones controles, aunque se podría aumentar el n analizado para obtener diferencias, sobretodo en la expresión de CD86.

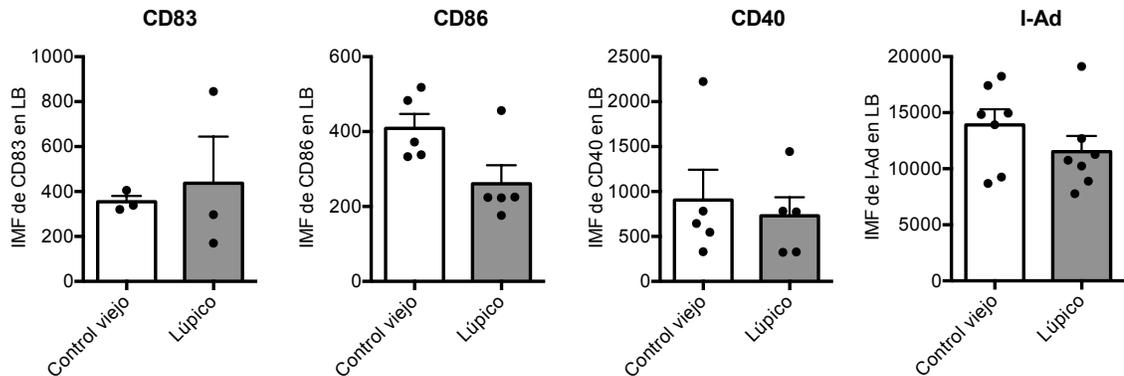


Figura 8. Linfocitos B del timo de ratones lúpicos y controles viejos expresan niveles similares de moléculas de coestimulación y de presentación de antígenos. Se analizó la expresión de CD83, CD86, CD40 e I-Ad en linfocitos B de timo de ratones controles viejos y lúpicos, mediante citometría de flujo. La población de linfocitos B se determinó como $CD19^+CD11c^-CD5^{-/int}$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: $P > 0.05$, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$. Valor de P en la expresión de CD86 $P = 0,0556$.

4.5. Receptores de migración celular en los linfocitos B del timo de ratones lúpicos y ratones controles.

Analizamos receptores de quimioquinas como CXCR3, CXCR5 y CCR9 implicados en la migración de células al timo (Drennan y col., 2009; Ishikawa and Matsushima, 2007; Zlotoff y col., 2010). Las figuras 9A y 9B muestran un aumento en la frecuencia (de 9% a

16% aprox.) y en los números absolutos (de 2×10^4 a 25×10^4 aprox.) de los linfocitos B CXCR3⁺ del timo de ratón lúpico comparado al ratón control. Sin embargo, estas diferencias son sutiles comparado a los cambios observados en la población de linfocitos B totales del timo entre ratones lúpicos y controles viejos (figura 7). Por otro lado, en los linfocitos B del timo de ratones lúpicos y controles no observamos diferencias en la expresión de CXCR5 (figura 9C y 9D).

El receptor de quimioquina CCR9 es interesante de analizar en los linfocitos B, ya que su ligando se expresa solamente en timo y en intestino. En las figuras 9E y 9F observamos que la expresión de CCR9 en los linfocitos B del timo de ratones lúpicos es significativamente más baja que la expresión de CCR9 en linfocitos B de timo de ratones controles.

El conjunto de los resultados sugiere que los linfocitos B presentes en el timo del ratón enfermo podrían llegar al timo por una vía diferente a la de las quimioquinas analizadas. Alternativamente, los linfocitos B podrían tener un origen intratímico.

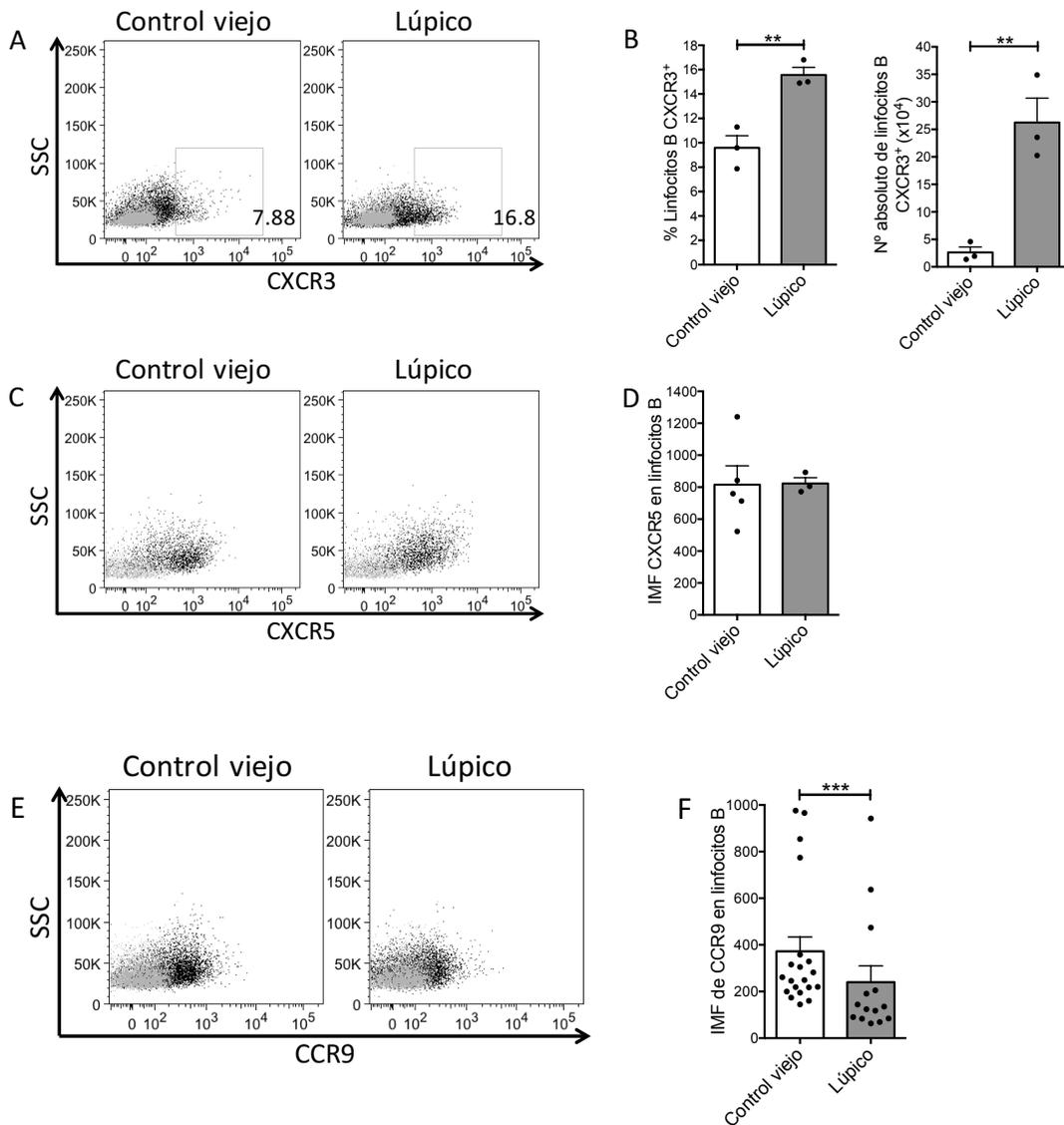


Figura 9. **Expresión de los receptores de quimioquinas CXCR3, CXCR5 y CCR9 en los linfocitos B de timo.** Se analizó la expresión de CXCR3, CXCR5 y CCR9 en linfocitos B de timo de ratones controles viejos y lúpicos, mediante citometría de flujo. La población de linfocitos B se determinó como CD19⁺CD11c⁻CD5^{-/int}. En (A) se muestra un ejemplo representativo de la expresión de CXCR3 en linfocitos B de timo de ratones control viejo y lúpico. En (B) se muestra el resumen de la población de linfocitos B CXCR3⁺, se grafica la frecuencia (izquierda) y el número absoluto (derecha). En (C) se muestra un ejemplo representativo de la expresión de CXCR5 en linfocitos B de timo de ratones control viejo y lúpico y en (D) el resumen de los datos obtenidos para la expresión (IMF: intensidad media de fluorescencia) de CXCR5 en los linfocitos B. En (E) se muestra un ejemplo representativo de la expresión de CCR9 en linfocitos B de timo de ratones control viejo y lúpico y en (E) el resumen de los datos obtenidos para la expresión de CCR9 en los linfocitos B. Los puntos graficados en color gris claro corresponden al control de FMO

(*Fluorescence Minus One*). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: $P > 0.05$, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$.

4.6. Los linfocitos B del timo de ratones lúpicos se agrupan en estructuras similares a centros germinales lo que se correlaciona con un aumento de las células plasmáticas.

Los linfocitos B que no han reconocido antígenos se denominan linfocitos B vírgenes y se caracterizan porque co-expresan las inmunoglobulinas IgM e IgD en su superficie. Los linfocitos B vírgenes una vez que reconocen su antígeno se activan y proliferan. Durante este proceso, la activación óptima de los linfocitos B se obtiene cuando interactúan con linfocitos T foliculares, ya que esto favorece el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas de IgM a IgG, IgA o IgE. Al final de este proceso los linfocitos B se diferencian en linfocitos B de memoria o células plasmáticas. Los linfocitos B de memoria son linfocitos que quedan disponibles para activarse frente a un nuevo encuentro con el antígeno, mientras que las células plasmáticas son las células especializadas en secretar anticuerpos (Taylor y col., 2012a). Además se ha descrito una población de linfocitos B de memoria IgM^+ que ha reconocido su antígeno y que podría permanecer expresando IgM en su superficie, la que ha sido definida como otra población de linfocitos B de memoria (Hara y col., 2015; Taylor y col., 2012b).

Inicialmente analizamos la capacidad de proliferación de los linfocitos B del timo, mediante el marcaje con Ki-67 en los linfocitos de B del timo de ratones controles viejos

y lúpicos. En la figura 10 se puede observar que la frecuencia de los linfocitos B Ki-67⁺ no cambia significativamente entre los linfocitos B del timo de ratones lúpicos o controles (figura 9B izquierda), sin embargo existe un aumento significativo en el número absoluto de los linfocitos B que se encuentran proliferando en el timo del ratón lúpico en comparación a los linfocitos B de timo de ratones controles (figura 9B derecha).

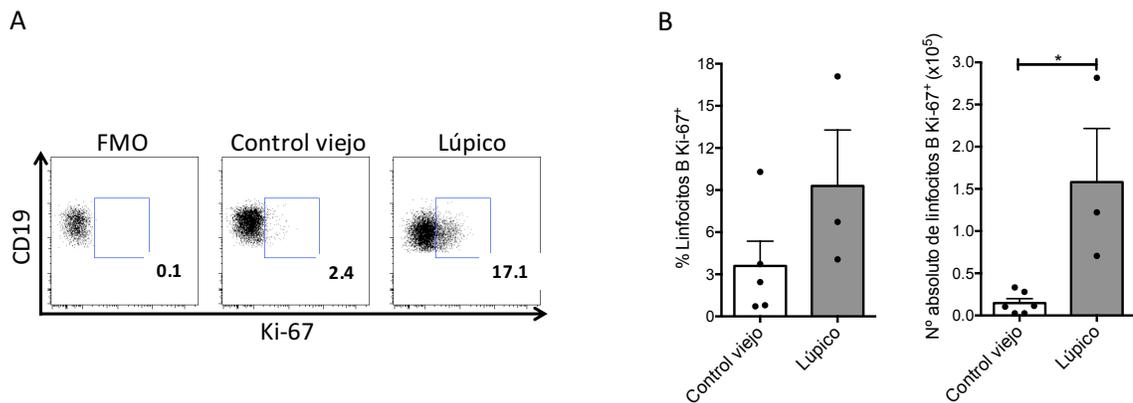


Figura 10. **Una proporción de los linfocitos B del timo de ratones lúpicos proliferan.** En (A) se evaluó Ki-67 en los linfocitos B de timo de ratones controles viejos y lúpicos, mediante citometría de flujo. FMO: *Fluorescence Minus One* (B) Resumen de la frecuencia de los linfocitos B Ki-67⁺ (izquierda) y del número absoluto (derecha). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: P>0.05, *: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001.

Luego, analizamos las poblaciones de linfocitos B vírgenes, linfocitos B de memoria que han cambiado de isotipo (swIlg⁺) y linfocitos B de memoria IgM⁺. La figura 11A muestra la estrategia de análisis de estas subpoblaciones en linfocitos B de timo de ratones control viejo y lúpico. La figura 11B muestra la cuantificación de la frecuencia (arriba) y el número absoluto (abajo) de estas subpoblaciones en los diferentes ratones. Se puede observar

que la frecuencia y el número absoluto de linfocitos B vírgenes y de memoria IgM^+ aumenta en el timo de ratones lúpicos en comparación a ratones controles. En cuanto a los linfocitos B de memoria que cambiaron de isotipo ($swIg^+$), disminuye la frecuencia en el ratón lúpico comparado a ratones controles y no presentan diferencias en los números absolutos. Con esto, el timo de ratones enfermos se estaría transformando en un reservorio tanto de linfocitos B vírgenes como de linfocitos B de memoria IgM^+ .

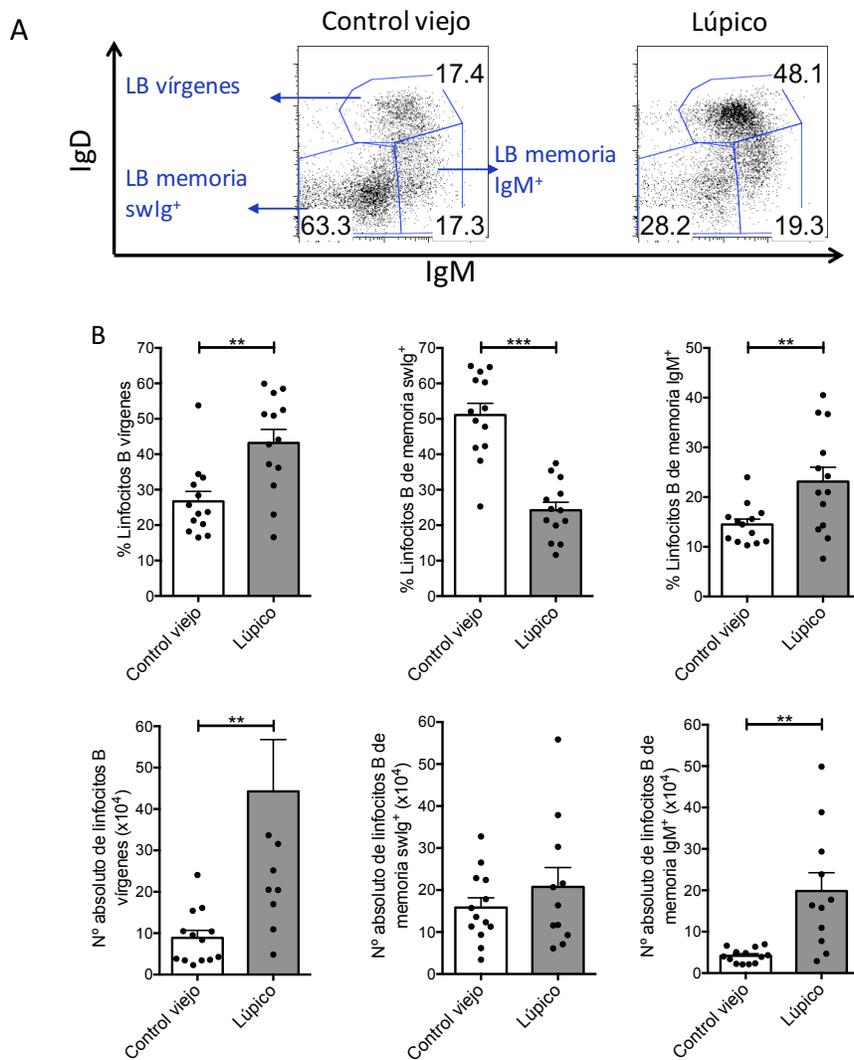


Figura 11. Poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria $swIg^+$ y de memoria IgM^+ en timo de ratones controles viejos y lúpicos. Se analizó la expresión de IgM e IgD en

linfocitos B de timo en ratones controles viejos y lúpicos. En (A) se muestra un ejemplo representativo de la expresión de IgD e IgM en linfocitos B de timo. El análisis fue realizado en una ventana de linfocitos B CD19⁺CD11c⁻GL7⁻ (GL7 es un marcador de centro germinal). Linfocitos B de memoria swlg⁺: linfocitos B de memoria que han cambiado de isotipo. En (B) se muestra el resumen de los datos, en la parte superior se grafican las frecuencias y abajo los números absolutos de las diferentes poblaciones. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: P>0.05, *: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001.

Posteriormente, analizamos la ubicación anatómica de los linfocitos B en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. La figura 12 muestra rebanadas de timo teñidos con anticuerpos a-CD4, a-CD8 y a-CD19 analizados por microscopía confocal. Se puede observar que el timo de los ratones controles de 3 y 5 meses de edad y prelúpico de 3 meses muestran de manera muy definida una estructura doble positiva para CD4 y CD8 (zona amarilla) lo que representa la corteza del timo, mientras que en la médula se observan solo células CD4⁺ o CD8⁺. En el caso de la imagen que corresponde al timo del ratón prelúpico de 5 meses también es posible definir la zona de corteza y médula, pero no se resaltó la separación entre estas estructuras para no interrumpir la distribución de los linfocitos B (azul). En el timo del ratón lúpico no se observan zonas de corteza y solo se observan células CD4⁺ y CD8⁺. La imagen de microscopía muestra que el timo del ratón lúpico pierde la estructura característica del timo que observamos en los ratones controles y prelúpicos, lo que podría tener consecuencias importantes en la interacción de los linfocitos T con los linfocitos B.

De manera interesante, se observó en el timo del ratón lúpico que, además del aumento evidente de linfocitos B con respecto a los timos de ratones controles y

prelúpicos, estos linfocitos B forman agrupaciones de células de tipo folicular, lo que no se observa en el timo de ratones controles y prelúpicos (figura 12). Estas agrupaciones celulares son muy similares a los centros germinales que se forman cuando los linfocitos B proliferan en los órganos linfoides secundarios.

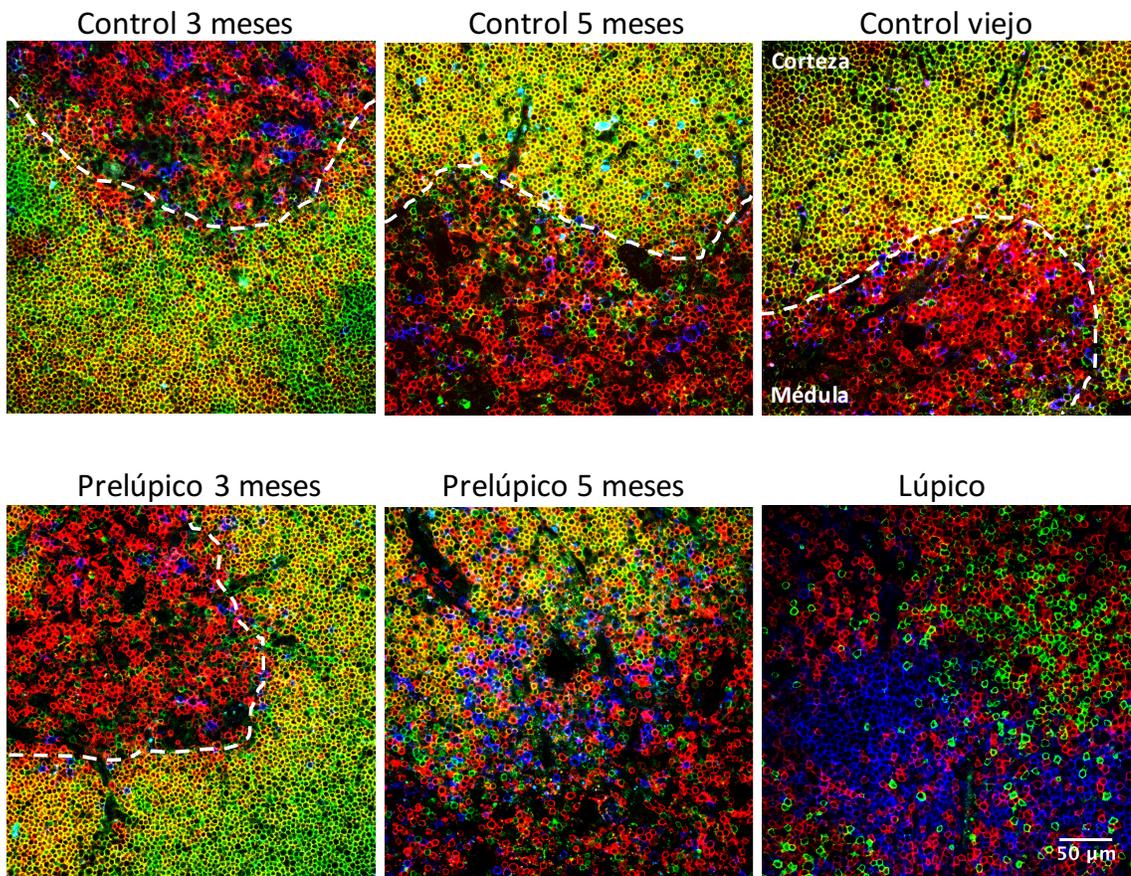


Figura 12. **Distribución anatómica de los linfocitos B en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpico.** Análisis de linfocitos B en rebanadas de timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos mediante microscopía confocal. Se analizó la expresión de CD4 y CD8 para determinar la estructura del timo y CD19 para determinar los linfocitos B. Se muestran un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes.

El aumento de células Ki-67⁺ en el timo del ratón lúpico junto con la distribución de los linfocitos B en estructuras similares a centros germinales sugiere que los linfocitos

B del timo están activados y diferenciándose. La activación del linfocito B vírgen puede producir la diferenciación a células plasmáticas que se caracterizan por la expresión de CD138 y por tener baja o mediana expresión de B220. En la figura 13 observamos que existe un aumento en la frecuencia (de 0,1% a 2% aprox.) de las células plasmáticas en el timo de ratones lúpicos en comparación a ratones controles y prelúpicos. En relación a los números absolutos encontramos un aumento significativo (de $0,5 \times 10^5$ a $1,5 \times 10^5$ aprox.) de las células plasmáticas del timo en los ratones lúpicos comparados a ratones controles viejos. Este aumento de células plasmáticas en el timo del ratón lúpico sugiere que el timo estaría actuando como un reservorio de células plasmáticas. La figura 13C muestra el análisis de las células plasmáticas de timo de ratones control viejo y lúpico mediante microscopía confocal. En el timo del ratón control las células plasmáticas (en color *cyan*) se distribuyen principalmente en la zona cortico-medular, mientras que en el timo del ratón lúpico se distribuyen entre los linfocitos B, las células CD4SP y CD8SP.

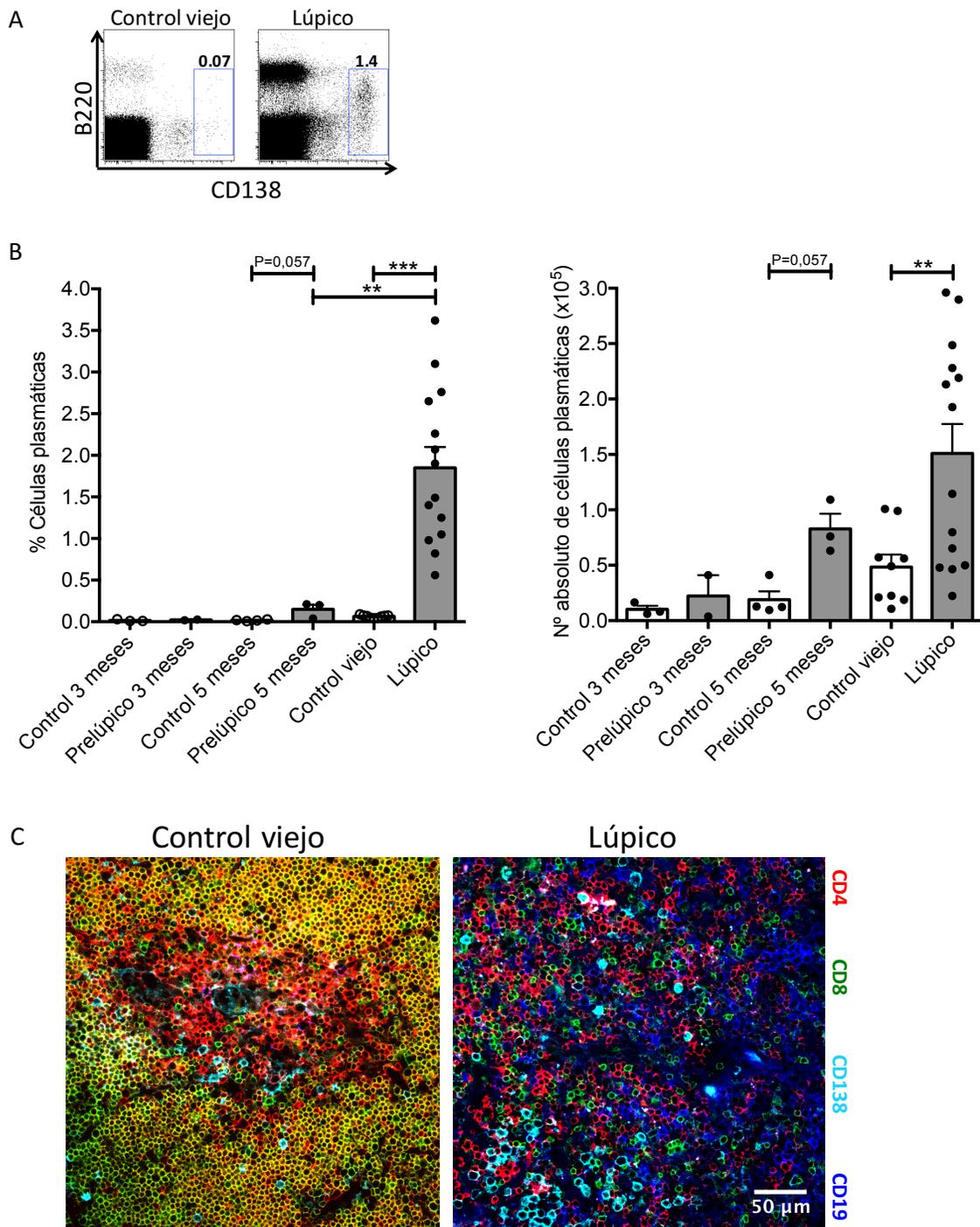


Figura 13. La población de células plasmáticas se encuentra aumentada en el timo del ratón lúpico. Se evaluó la expresión de B220 y CD138 en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos, mediante citometría de flujo. Se analizó la población de células plasmáticas ($CD138^+B220^{-/int}$). (A) Ejemplo representativo de las células plasmáticas en timo de ratones control viejo y lúpico. (B) Resumen de la frecuencia de la población de

células plasmáticas (izquierda) y del número absoluto (derecha). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: $P > 0.05$, *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$. (C) Análisis de células plasmáticas en rebanadas de timo de ratones control viejo y lúpico mediante microscopía confocal. Se analizó la expresión de CD4 y CD8 para determinar la estructura del timo CD19 y CD138 para determinar los linfocitos B y células plasmáticas respectivamente. Se muestra un ejemplo representativo de 2 experimentos independientes.

El conjunto de estos resultados muestra que el timo de ratones lúpicos tiene principalmente linfocitos T activados, entre los que se encuentran los linfocitos T de memoria y foliculares. Por otra parte, existe un aumento de linfocitos B que se distribuyen en estructuras similares a un centro germinal, lo que se correlaciona positivamente con el aumento de células plasmáticas en el timo.

4.7. Las células plasmáticas del timo de ratones lúpicos secretan auto-anticuerpos.

Mediante ELISpot analizamos los anticuerpos secretados por las células plasmáticas del timo de ratones controles viejos y ratones lúpicos. Inicialmente evaluamos las células que secretan IgG. En la figura 14A observamos que las células del timo del ratón lúpico producen un número considerablemente mayor de spots a-IgG que el timo del ratón control, indicando que hay más células con la capacidad de diferenciarse a células secretoras de anticuerpos. Comparamos la respuesta IgG del timo con la de otros órganos como médula ósea y bazo, que es donde normalmente se encuentran las células secretoras de anticuerpos. En la figura 14B observamos que en bazo y timo de ratones

lúpicos hay mayor secreción de IgG en comparación a ratones controles, mientras que en la médula ósea no se encontraron diferencias en la secreción de IgG.

La secreción de anticuerpos anti-ADN es una característica distintiva del lupus, ya que existe una correlación directa entre el título de este autoanticuerpo y el desarrollo de la enfermedad (Cheng y col., 2013; Wang y col., 2014). Por lo tanto, analizamos la secreción de IgG anti-ADN y observamos en la figura 14A que solo el timo del ratón lúpico presenta spots contra ADN. La secreción de anticuerpos anti-ADN también se analizó en médula ósea y bazo (figura 14C). El resultado muestra que solo las células plasmáticas provenientes de los animales enfermos generan más spots específicos contra ADN en comparación al control.

Por otro lado, analizamos la producción de IgM anti-ADN y demostramos que las células del timo del ratón lúpico generan más spots de tipo IgM que las células provenientes del timo del ratón control, pero estos spots no son específicos contra ADN (figura 15).

Por lo tanto, una proporción de las células que secretan anticuerpos IgG en el timo son específicas contra componentes nucleares que permiten el desarrollo del lupus.

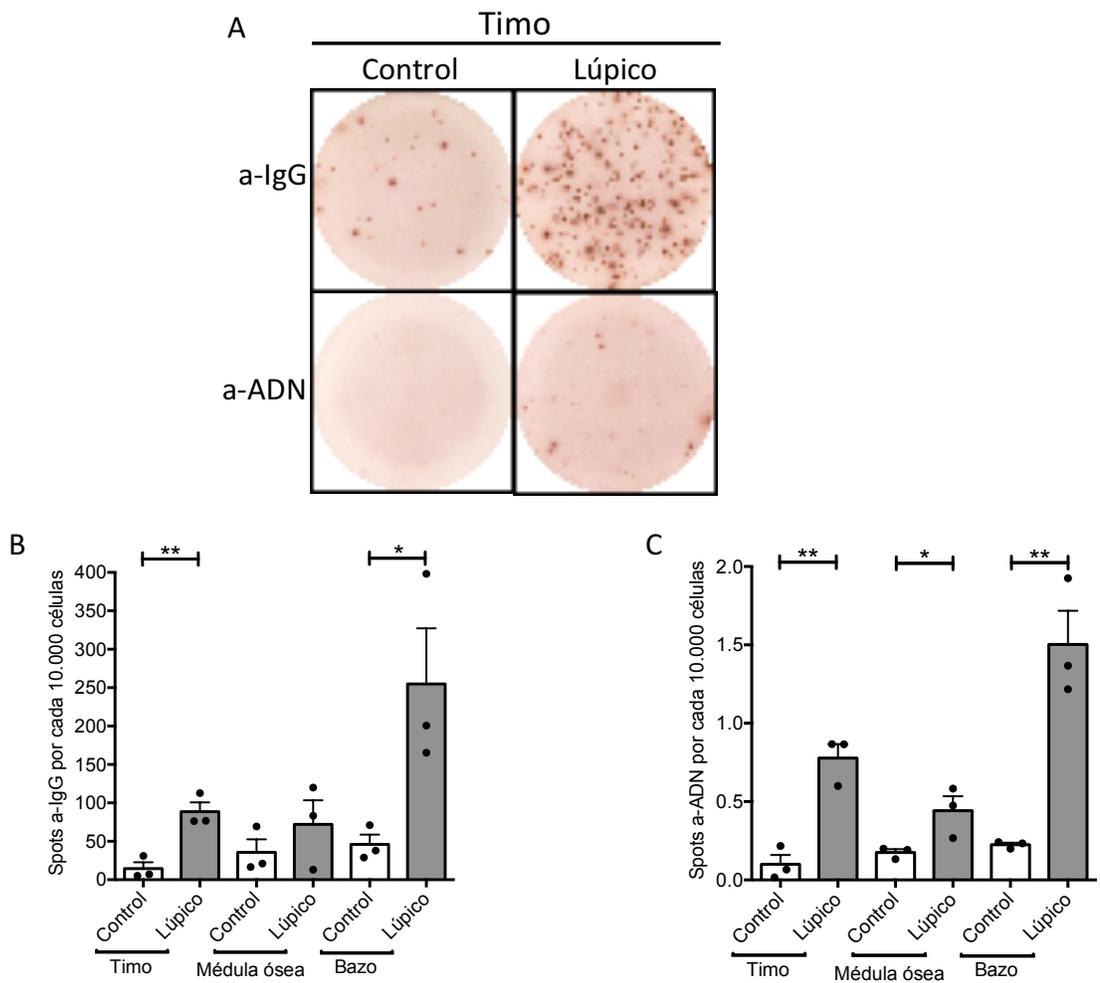


Figura 14. El timo de ratones enfermos de lupus tiene células secretoras de autoanticuerpos de tipo IgG. Análisis de ELISpot realizado con células de timo, médula ósea y bazo provenientes de ratones controles viejos y lúpicos. (A) Se evaluó la secreción de IgG total (arriba) y la respuesta contra ADN (abajo). En (B) se muestra el resumen de la cuantificación de los spots a-IgG. La secreción de anticuerpos se evaluó en triplicado, los spots graficados corresponden al promedio del triplicado. En (C) se grafica la cuantificación de los spots a-ADN.

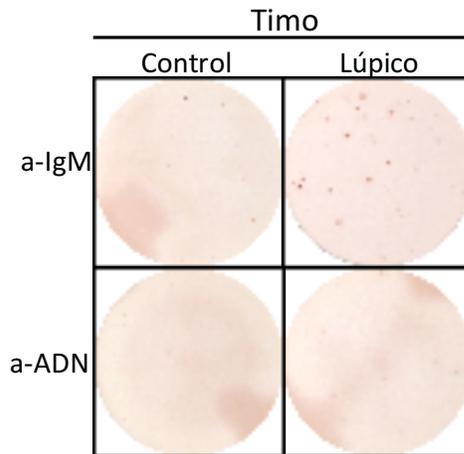


Figura 15. **Los autoanticuerpos específicos contra ADN del timo del ratón lúpico no son de tipo IgM.** Análisis de ELISpot realizado con células de timo provenientes de ratones controles viejos y lúpicos. Se evaluó la secreción de IgM total (arriba) y la respuesta contra ADN (abajo). Experimento representativo de dos experimentos independientes.

Estos resultados muestran que el timo del ratón lúpico posee un microambiente propicio para albergar linfocitos B y células productoras de anticuerpos, pero más interesante aún es que existe una proporción de estas células que secretan específicamente autoanticuerpos característicos del lupus.

4.8. Los linfocitos T foliculares presentes en el timo del ratón lúpico activan a linfocitos B de timo.

Los linfocitos B para diferenciarse a células productoras de anticuerpos requieren de la ayuda de linfocitos T especializados: los linfocitos T foliculares. Estos linfocitos T entregan señales como la citoquina IL-21 y coestimulación a través del ligando de CD40 que inducen la activación y diferenciación de los linfocitos B. Este proceso ocurre

normalmente en órganos linfoides secundarios como los ganglios o el bazo. Considerando el aumento de linfocitos T foliculares en el timo de ratones lúpicos, junto al aumento de linfocitos B y células plasmáticas, evaluamos *in vitro* la capacidad de los linfocitos T foliculares aislados de ratones lúpicos para activar linfocitos B de timo. Para esto aislamos linfocitos T foliculares y linfocitos B del timo de ratones lúpicos y se cultivaron por 5 días. Además se aislaron linfocitos T no foliculares para comprobar que la activación de los linfocitos B es generada específicamente por los linfocitos T foliculares. El nivel de activación de los linfocitos B de timo se comparó con la activación generada en linfocitos B de bazo.

Analizamos la proliferación de los linfocitos B y la expresión de GL7, que es un marcador clásicamente utilizado para distinguir linfocitos B activados que forman un centro germinal. En la figura 16 observamos que los linfocitos T foliculares provenientes de timo de ratones lúpicos activan a los linfocitos B de forma similar a los linfocitos T foliculares aislados del bazo, además este efecto es específico de los linfocitos T foliculares, ya que al activar los linfocitos B con linfocitos T no foliculares no se observa el mismo efecto.

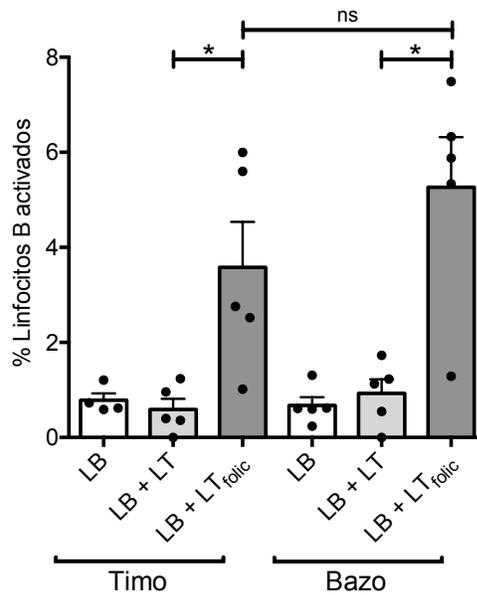


Figura 16. Linfocitos T foliculares provenientes de timo de ratones lúpicos activan a los linfocitos B de timo a un nivel similar de lo que ocurre con las células de bazo. El cocultivo fue realizado con linfocitos T foliculares (PD1⁺CXCR5⁺), linfocitos T no foliculares (PD1⁻CXCR5⁻) y linfocitos B de timo y bazo de ratones lúpicos. Después de 5 días de cultivo se evaluó GL7 dentro de la población de linfocitos B que proliferó (evaluado por la dilución del *cell trace violet*), esto es lo que se grafica como linfocitos B activados. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: P>0.05, *: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001.

4.9. Los linfocitos B del timo de ratones lúpicos favorecen la diferenciación de los timocitos a linfocitos T foliculares.

Dado que los linfocitos B pueden actuar como células presentadoras de antígenos evaluamos el efecto de los linfocitos B del timo en la diferenciación de los timocitos. Para esto realizamos cocultivos de linfocitos B de timo de ratones lúpicos y controles con timocitos provenientes de ratones controles. La figura 17 muestra que los linfocitos B del

timo del ratón lúpico generan linfocitos T foliculares a diferencia de los linfocitos B del timo de ratones controles. Los linfocitos B de timo de ratones lúpicos por sí solos permiten diferenciar los timocitos en un fenotipo efector de linfocito T folicular, lo que no se observa con los linfocitos B de timo de ratones controles. Este resultado sugiere que en el timo del ratón lúpico los linfocitos B podrían contribuir, en parte, al aumento de células T CD4⁺ diferenciadas en el timo.

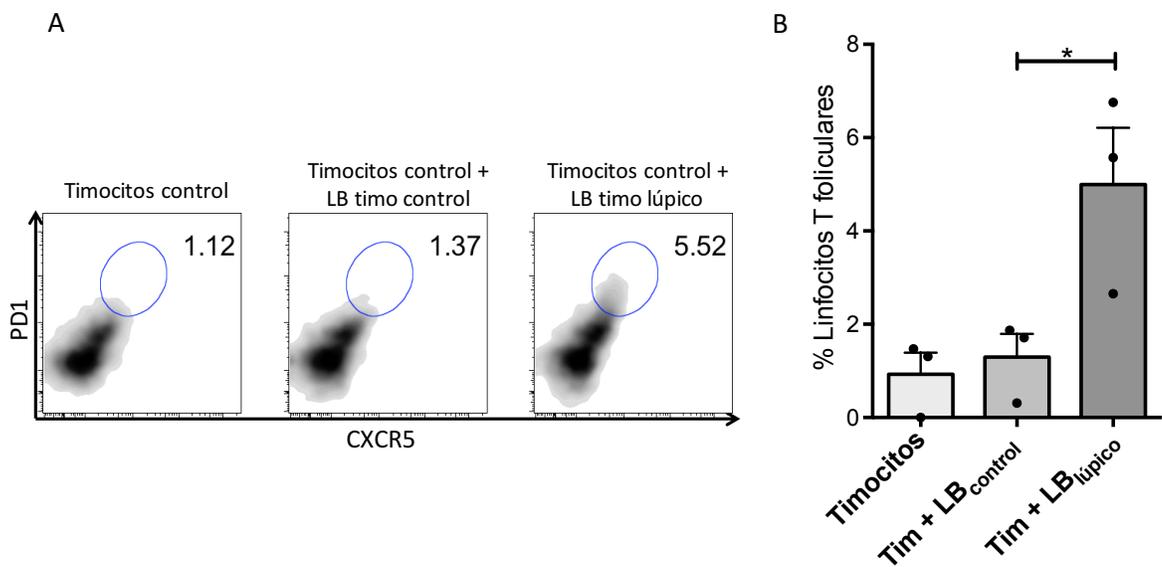


Figura 17. Linfocitos B provenientes de timo de ratones lúpicos generan un aumento de linfocitos T foliculares. El cocultivo fue realizado con linfocitos B de timo con timocitos a los que se les eliminaron las células presentadoras de antígenos. Los linfocitos B se aislaron por *cell sorting* y provenían de timo de ratones controles viejos o lúpicos. En este cocultivo además se agregó IL-7 (6 ng/mL) para favorecer la supervivencia de los timocitos. Después de 5 días de cocultivo se analizó la población de linfocitos T foliculares (determinados por PD1⁺CXCR5⁺) mediante citometría de flujo. En la figura se muestra el análisis realizado a partir de una ventana de células CD4SP (CD4⁺CD8⁻). En (A) se muestra un ejemplo representativo de los linfocitos T foliculares generados después de 5 días de cocultivo. (B) Resumen de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prism 6, se realizó t test pareado para comparar los grupos, las significancias se determinaron según los valores de P, ns: P>0.05, *: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001.

5. DISCUSIÓN

El LES es una enfermedad autoinmune crónica de etiología desconocida caracterizada por la formación de complejos inmunes, que se depositan en los tejidos causando inflamación. En el LES tanto los linfocitos T como los linfocitos B se encuentran hiperactivados y reconocen autoantígenos relacionados con proteínas nucleares. Los linfocitos B son las únicas células del sistema inmune que se diferencian a células plasmáticas que secretan anticuerpos. Para que esta respuesta inmune sea eficiente es necesario que linfocitos T foliculares entreguen señales de ayuda a linfocitos B, para inducir su activación y proliferación, lo que permite finalmente que los linfocitos B se diferencien a células plasmáticas.

En el LES, el sistema inmune permite la supervivencia de linfocitos B y T que reconocen autoantígenos y generan una respuesta inmune contra antígenos propios, permitiendo el desarrollo de la enfermedad (Pieterse and van der Vlag, 2014; Wen y col., 2012). Los linfocitos B se generan principalmente en la médula ósea, mientras que los linfocitos T que circulan por el organismo se generan en el timo. La selección de los linfocitos T en el timo es un paso fundamental para mantener la tolerancia inmune ya que si este proceso falla, pueden emigrar del timo linfocitos T capaces de activarse frente a antígenos propios. Luego, estos linfocitos T autorreactivos pueden ejercer su función de ayuda a linfocitos B autorreactivos, induciendo la producción de autoanticuerpos, lo que desencadena un proceso de autoinmunidad como el LES (Carl y col., 2008; Takeno y col., 1997).

El timo además de ser esencial en los procesos de tolerancia inmune, es un órgano linfoide primario que sufre importantes cambios morfológicos a lo largo de la edad, tanto en humanos como en ratones. El timo involuciona con la edad, durante este proceso se reduce su tamaño debido a la pérdida de celularidad y además se afecta el desarrollo de los linfocitos T que se hace menos eficiente, por lo que disminuye la emigración de linfocitos T vírgenes desde el timo (Linton and Dorshkind, 2004; Lynch y col., 2009; Palmer, 2013).

En este trabajo, efectivamente comprobamos que el timo involuciona con la edad y que esta involución se exagera en animales enfermos de lupus NZBWF1. Se ha demostrado que la involución tímica afecta la tolerancia central, lo que lleva a la liberación de linfocitos T autorreactivos a la circulación. Estos linfocitos adquieren rápidamente un fenotipo activado y son las células responsables de inducir de manera sistémica un estado de bajo grado de inflamación denominado "*inflammaging*", lo que podría facilitar el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas relacionadas con la edad (Coder y col., 2015). Es por esto que, se propone que mantener el timo en edades adultas podría mejorar la eficiencia de la respuesta inmune (Lynch y col., 2009; Palmer, 2013; Sauce and Appay, 2011).

Junto a los cambios en el tamaño del timo en animales enfermos, observamos alteraciones en las subpoblaciones celulares como en los linfocitos T CD4⁺. Normalmente en el timo se encuentran linfocitos T en vías de diferenciación como células CD4SP inmaduras (CD62L^{int}CD44^{bajo}) y CD4SP maduras (CD62L^{alto}CD44^{bajo}) con capacidad para

migrar fuera del timo como linfocitos T vírgenes. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el timo de los ratones lúpicos contiene significativamente menos linfocitos T CD4⁺ en vías de diferenciación y vírgenes que ratones controles. Esto sugiere fuertemente que el timo de ratones lúpicos presenta una reducida capacidad para producir y exportar linfocitos T vírgenes a la periferia. Se ha reportado que durante la inmunosenescencia del timo al disminuir la emigración de linfocitos T a la periferia, estos sobreviven durante más tiempo, por lo tanto si salen linfocitos T autorreactivos del timo estos tienen mejor supervivencia y con ello mayor probabilidad de activarse y de favorecer una enfermedad autoinmune (Prelog, 2006; Tatari-Calderone et al., 2012). En nuestro modelo murino el lupus se desarrolla en animales con más de 6 meses de edad, por lo que las alteraciones propias del envejecimiento podrían favorecer o mantener la enfermedad en este modelo.

Junto a la reducción de linfocitos T vírgenes en el timo de ratones lúpicos encontramos un aumento notable de linfocitos T experimentados (CD44⁺) que ya han interactuado con su antígeno y se han diferenciado en linfocitos T de memoria y efectores. En este trabajo demostramos que la población de linfocitos T de memoria con capacidad de recircular (CD103⁺CD69⁻) se encontraba en la misma proporción en el timo de ratones lúpicos y controles. Sin embargo, los linfocitos T de memoria residentes de tejido que no recirculan (CD103⁺CD69⁺) se encuentran significativamente aumentados en el timo del ratón lúpico, donde probablemente entran en contacto con los linfocitos B presentes en mayor proporción durante la progresión de la enfermedad favoreciendo su activación.

Por otra parte, una proporción de los linfocitos T diferenciados presentes en el timo de los ratones lúpicos son linfocitos T foliculares. A pesar de que se ha descrito una recirculación de linfocitos T experimentados (efectores y de memoria) al timo, esta recirculación ocurre solo si los linfocitos se han activado previamente y en general corresponden a porcentajes bajo el 1% de las células del timo total (Agus y col., 1991; Hardy y col., 2001; Hodge y col., 2012), muy por debajo de nuestros resultados. Además, se ha descrito que durante el envejecimiento se produce una acumulación de linfocitos T de memoria en el timo (Palmer, 2013) y nuestros resultados muestran que en los ratones lúpicos se produce un aumento considerable de estas células comparado a los ratones controles de la misma edad. En el caso de una enfermedad autoinmune como el lupus, donde la inflamación es sistémica y crónica, es posible que linfocitos T activados lleguen al timo desde la circulación y que la expresión de determinadas moléculas de adhesión favorezca su acumulación. Nuestros resultados sugieren que el timo de ratones lúpicos se convierte en un reservorio de linfocitos T de memoria y linfocitos T foliculares, en desmedro de su función “clásica” que es la de exportar linfocitos T vírgenes. Es posible que el exceso de linfocitos T efectores y de memoria en el timo de ratones lúpicos impida que este órgano mantenga la tolerancia inmunológica.

El timo de ratones lúpicos actúa como un órgano linfoide secundario

Los linfocitos T foliculares en los órganos linfoides secundarios son claves para el establecimiento del centro germinal. Los linfocitos T foliculares requieren de la

estimulación constante a través de la presentación antigénica y la coestimulación por parte de los linfocitos B presentes en el centro germinal, permitiendo a su vez que los linfocitos B se activen. Por lo tanto, la permanencia del centro germinal depende de la duración de la interacción entre el linfocito T folicular y el linfocito B (Baumjohann y col., 2013). Sorprendentemente, junto al aumento de los linfocitos T foliculares en el timo de los ratones lúpicos, encontramos un aumento significativo de linfocitos B y células plasmáticas. Además, observamos que en el timo de los ratones lúpicos existe una población de linfocitos B que se encuentra en activa proliferación y, por lo tanto, en constante activación. Junto a esto, demostramos por microscopía confocal que el timo de los ratones lúpicos presenta una estructura diferente de la de un timo normal, caracterizado por la pérdida de la corteza tímica, donde los linfocitos B forman estructuras foliculares similares a centros germinales, característicos de los órganos linfoides secundarios. El conjunto de estos resultados nos lleva a proponer que el timo en condiciones particulares como el lupus, poseería más bien una función similar a un órgano linfoide secundario. Estos hallazgos en el timo de los ratones lúpicos se correlacionan con las observaciones hechas en pacientes con miastenia gravis, donde se ha reportado que desarrollan centros germinales activos en el timo y que las células plasmáticas del timo secretan autoanticuerpos. A diferencia del lupus, pacientes con miastenia gravis se caracterizan por presentar alteraciones graves en el timo ya que en un gran porcentaje desarrollan timomas (Romi, 2011; Zhang et al., 2016), en cambio pacientes con lupus no desarrollan necesariamente timomas y es por esto que las alteraciones en el timo han

sido muy poco reportadas. A pesar de esta diferencia, la composición celular y el cambio funcional del timo afecta a ambas enfermedades de manera similar, lo que sugiere que estas alteraciones en el timo podrían producirse en estados de autoinmunidad, aun así es necesario realizar estudios en timo en otras enfermedades autoinmunes para concluir esto.

El origen de los linfocitos B en el timo

Con respecto al aumento de los linfocitos B en el timo de los ratones lúpicos, se ha descrito que en condiciones de infección o de inflamación los linfocitos B podrían migrar al timo (Hodge y col., 2012). Además resultados recientes de nuestro laboratorio muestran que el timo de humanos adultos podría tener una nueva función, la de actuar como un nicho para linfocitos B de memoria y células plasmáticas específicas contra antígenos para los que fuimos vacunados (Nuñez y col, 2016). Dado que en el modelo murino de lupus utilizado en este trabajo la inflamación crónica y sistémica no disminuye, nuestros resultados sugieren que los linfocitos B podrían provenir de la circulación y acumularse progresivamente en el timo, lo que podría dar cuenta del aumento excesivo de linfocitos B en el timo de los ratones enfermos.

La migración de las células del sistema inmune a los tejidos ocurre mediante quimioquinas que atraen a células que expresan su receptor. El receptor de quimioquina CXCR3 se une a las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, que son responsables del reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de infección o inflamación. En la

enfermedad autoinmune esclerosis múltiple se ha reportado que muestras de cerebro de pacientes con esta enfermedad presentan un aumento en la expresión de CXCR3, lo que se correlaciona con un aumento de CXCL10 en el suero de los paciente en la fase activa de la enfermedad. En otra enfermedad autoinmune, artritis reumatoide, se ha reportado que los linfocitos T presentes en los tejidos sinoviales tienen una alta expresión de CXCR3 y en conjunto a esto, han encontrado que los fibroblastos sinoviales son los principales productores de CXCL9, 10 y 11 (Lacotte et al., 2009). En pacientes con LES se ha reportado la presencia de linfocitos T CXCR3⁺ y linfocitos B CXCR3⁺ en tejido de piel con dermatitis y en tejido de riñón, que son tejidos blanco de esta enfermedad (Tanaka et al., 2018; Thorpe et al., 2014). Nuestros resultados muestran un aumento significativo de la población de linfocitos B CXCR3⁺ en el timo de los ratones lúpicos, lo que sugiere que los linfocitos B podrían migrar al timo por esta vía. A pesar de que nosotros no evaluamos la expresión de los ligandos para CXCR3 en el timo, se ha reportado que en humanos las células epiteliales de la médula del timo expresa los ligandos para CXCR3, sugiriendo que esta expresión de CXCR3 sería importante en la migración de linfocitos T y células NK en desarrollo en el timo (Romagnani et al., 2001). Sería interesante analizar en experimentos futuros la expresión de los ligandos para CXCR3 en el timo pero en condiciones de autoinmunidad como el LES.

Otro receptor de quimioquina que analizamos en este trabajo es CXCR5 el cual favorece la migración de los linfocitos B a los folículos, mediante la expresión del ligando para CXCR5 que es BLC (*B lymphocyte chemoattractant*). Se ha descrito que en el timo de

ratones lúpicos NZBWF1 aumenta la expresión de BLC durante la enfermedad (Sato et al., 2004). Nuestros resultados no muestran cambios en el nivel de expresión de CXCR5 entre los linfocitos B presentes en el timo de los ratones lúpicos comparado a los ratones controles, pero dado que la expresión de BLC estaría aumentada en el timo de los ratones enfermos, de igual forma podría favorecer la migración de los linfocitos B de la periferia al timo.

Finalmente, el receptor de quimioquina CCR9 forma parte del desarrollo normal de los linfocitos T en el timo, ya que regula la migración de los timocitos dentro del timo durante su desarrollo. El ligando para CCR9 es CCL25 y en el timo lo producen las células dendríticas y las células epiteliales. Nuestros resultados muestran que la expresión de CCR9 es más baja en los linfocitos B del timo del ratón lúpico comparado al control, lo que sugiere que los linfocitos B no estarían migrando al timo por esta vía, sin embargo es necesario evaluar la expresión de su ligando en el timo en condiciones de la enfermedad. Hasta este momento, no existen trabajos que reporten cambios en la expresión de CCL25 en el timo durante estados de inflamación o de autoinmunidad. Sin embargo, se ha reportado que en pacientes con el síndrome de Sjödren, que es una enfermedad autoinmune donde se afectan las glándulas salivares y lagrimales, aumenta la expresión de CCL25 en las glándulas salivares lo que se correlacionó con una hiperactividad de los linfocitos B (Blokland et al., 2017). Esto sugiere que, dado que en nuestra investigación encontramos que el timo forma parte del proceso de autoinmunidad en el modelo murino NZBWF1, es posible que exista un aumento de CCL25 en el timo de ratones enfermos,

pero esto debe ser confirmado con resultados experimentales. No obstante, otras combinaciones de ligandos de quimioquinas y receptores de quimioquinas en los linfocitos B podrían ser responsables de la acumulación de linfocitos B en el timo.

Otra posibilidad que podría dar cuenta del aumento de los linfocitos B en el timo de los ratones enfermos es la existencia de progenitores de linfocitos B en el timo (Akashi y col., 2000; Perera y col., 2013) que se estén activando durante el desarrollo de la enfermedad. El origen de los linfocitos B clásicamente se asocia a la médula ósea, por lo que lo que el origen intratímico ha sido mucho menos estudiado (Yurasov y col., 2005; Zhang y col., 2004). Aunque no existen trabajos que relacionen el desarrollo intratímico de los linfocitos B en estados inflamatorios o de autoinmunidad, se ha reportado que los progenitores linfoides del timo se encuentran reprimidos en su diferenciación a linfocito B, favoreciendo el desarrollo de los linfocitos T en el timo, por lo que que en condiciones que se pierde este control se produce el desarrollo de los linfocitos B en el timo (Xiao et al., 2018). Aunque este punto no fue tratado en este trabajo, sería interesante estudiar la represión del desarrollo de linfocitos B en el timo en condiciones de autoinmunidad.

Nuestros resultados no permiten concluir respecto del origen de los linfocitos B en el timo, pero cualquiera sea el origen de los linfocitos B, nuestros resultados demuestran que una proporción de los linfocitos B prolifera en el timo lo cual sugiere que podría tratarse de linfocitos B que se están desarrollando en el timo y/o de linfocitos B que podrían estar llegando desde la periferia. Por lo tanto sugerimos que el origen de los linfocitos B en el timo de los ratones lúpicos podría ser mixto.

Los linfocitos B presentes en el timo son funcionales y una proporción de ellos son autorreactivos.

Cuando evaluamos las subpoblaciones de linfocitos B presentes en el timo de los ratones lúpicos encontramos un aumento significativo en la frecuencia y número absoluto de linfocitos B vírgenes y de memoria IgM^+ en comparación a los linfocitos B del timo de ratones controles. Este aumento podría deberse a cualquiera de los mecanismos explicados anteriormente: desarrollo intratímico o migración desde la periferia. Con respecto a los linfocitos B de memoria que han hecho el cambio de isotipo ($swIg^+$), estos se encuentran disminuidos en frecuencia en el timo de animales enfermos en comparación a ratones controles, pero no hay diferencias en números absolutos. La disminución de la frecuencia de los linfocitos B de memoria $swIg^+$ en el timo de los ratones lúpicos podría deberse a una diferenciación activa a células plasmáticas en el timo. Esto se correlaciona positivamente con nuestros resultados donde encontramos que las células plasmáticas se encuentran significativamente aumentadas en el timo de los ratones lúpicos en comparación a ratones controles.

El aumento de las células secretoras de autoanticuerpos de tipo IgG específicos contra componentes nucleares se ha asociado directamente con el aumento de autoanticuerpos circulantes, con el daño renal y la progresión del LES (Gesheva y col., 2014; Wang y col., 2014). En este trabajo determinamos mediante ELISpot el isotipo de las inmunoglobulinas producidas por las células plasmáticas presentes en el timo de los ratones lúpicos y las comparamos con la secreción de las células plasmáticas del timo de

ratones controles. Nuestros resultados de ELISpot muestran que las células plasmáticas del timo de ratones lúpicos producen mayoritariamente IgG comparado a IgM, y que una proporción de las IgG son específicas contra ADN. Estas observaciones concuerdan con lo descrito por Jost y cols. donde evalúan las Igs en suero de pacientes enfermos de lupus y encuentran que los autoanticuerpos de tipo IgG se encuentra significativamente elevados en comparación a los IgM (Jost y col., 2014). Sin embargo, nuestros resultados no permiten resolver si el cambio de isotipo se produjo en el timo o si son linfocitos B que realizaron el cambio de isotipo en algún órgano linfoide secundario periférico. Esto merece atención ya que si la activación de los linfocitos B ocurre en el timo, es muy probable que se generen linfocitos B autorreactivos, ya que los antígenos presentados en el timo son propios. Por otra parte, nosotros demostramos que el timo de los ratones lúpicos posee linfocitos T foliculares los cuales participan en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. Interesantemente, estos linfocitos T foliculares tienen la capacidad de activar a los linfocitos B del timo, tal como lo mostramos en experimentos de cocultivo *in vitro*. Esto sugiere fuertemente que dada la presencia de linfocitos T foliculares en el timo del ratón lúpico es posible que se favorezca el cambio de isotipo de los linfocitos B en el timo del ratón lúpico.

El análisis de rebanadas de timo por microscopía confocal, mostró la formación de estructuras foliculares de tipo centros germinales en el timo de los ratones lúpicos, tal como ocurre en órganos linfoides secundarios, lo que refuerza la idea de que los linfocitos B pueden activarse en el timo. La presencia de centros germinales en el timo es un

fenómeno que ya se ha descrito en otra enfermedad autoinmune: miastenia gravis. Junto con ello se ha reportado el aumento de linfocitos T foliculares, linfocitos B y células plasmáticas que secretan autoanticuerpos (Berrih-Aknin y col., 2013; Zuckerman y col., 2010). En miastenia gravis las alteraciones en el timo han sido ampliamente documentadas ya que los pacientes tienen una alta predisposición a desarrollar timos hiperplásicos. La hiperplasia tímica se correlaciona con el aumento de autoanticuerpos, mientras que pacientes con un timo normal o involucionado presentan bajos títulos de anticuerpos (Berrih-Aknin y col., 2013). En pacientes con LES no existen estudios que relacionen el desarrollo de la enfermedad con cambios en el timo de los pacientes.

Una pregunta válida que nos podemos hacer es si la secreción de anticuerpos en el timo de los ratones susceptibles de desarrollar lupus contribuyen a perpetuar la enfermedad. En el caso de pacientes con miastenia gravis se ha reportado que posterior al procedimiento de timectomía se reduce significativamente el título de autoanticuerpos, incluso 5 años después del procedimiento, pero esto no se correlaciona directamente con una reducción en los síntomas de la enfermedad (Okumura et al., 2003). En pacientes con LES que han desarrollado timomas y se les ha practicado una timectomía también hay resultados dispares, algunos pacientes se mejoran de los síntomas del lupus, pero en ningún caso se les suspende la medicación, sin embargo en otros casos no hay cambios (Bozzolo et al., 2000). Por lo tanto, la relevancia de la producción de anticuerpos del timo en la enfermedad es aún controversial.

Actualmente, con el fin de probar directamente el papel del timo en el desarrollo del lupus, estamos realizando experimentos de trasplantes de timo provenientes de ratones lúpicos en ratones prelúpicos y controles. Con esto, esperamos evaluar si los eventos propios del timo de ratones lúpicos son o no desencadenantes de la enfermedad o contribuyen a la mantención y desarrollo de la enfermedad.

Los linfocitos B actúan como células presentadoras de antígeno y generan linfocitos T foliculares en el timo de ratones lúpicos.

Los linfocitos B también pueden actuar como células presentadoras de antígenos al interactuar con los linfocitos T. Cuando analizamos el fenotipo de los linfocitos B en relación a moléculas de coestimulación y de presentación de antígenos no observamos diferencias entre los linfocitos B de timo de ratones lúpicos y controles viejos. A pesar de esto, al cultivarlos con timocitos de ratones controles de 2 meses de edad, encontramos que los linfocitos B del timo de los ratones lúpicos favorecen la diferenciación de linfocitos T foliculares en comparación a los linfocitos B de timo de ratones controles. Recientemente, Cortini y col. describió que los linfocitos B de bazo inducen la diferenciación de los linfocitos T a linfocitos T foliculares. Además, estos autores demostraron que la expresión de OX40L en los linfocitos B de bazo es importante para el desarrollo de linfocitos T foliculares y que contribuye a la patogénesis del lupus (Cortini y col., 2017). A pesar de que no evaluamos este marcador en los linfocitos B del timo de ratones lúpicos, proponemos que en el timo ocurriría un proceso de retroalimentación

positiva en la que los linfocitos B favorecerían el desarrollo de linfocitos T foliculares los que a su vez activarían a los linfocitos B para producir células plasmáticas que secreten autoanticuerpos.

6. RESUMEN DE RESULTADOS

- El timo de ratones lúpicos involuciona de manera exacerbada en comparación a ratones controles. La celularidad del timo de ratones lúpicos es 3 veces menor que la de ratones controles de la misma edad.

- El timo de ratones lúpicos contiene significativamente menos linfocitos T CD4⁺ en desarrollo y vírgenes, en comparación a ratones controles.

- El timo de ratones lúpicos contiene principalmente linfocitos T CD4⁺ de memoria y efectores, entre ellos, linfocitos T foliculares.

- En el timo de ratones lúpicos, hay un aumento significativo de linfocitos B vírgenes, linfocitos B de memoria IgM⁺ y células plasmáticas, en comparación a ratones controles.

- El timo de ratones lúpicos contiene mayor cantidad de linfocitos B en proliferación que el timo de ratones controles.

- Una proporción de las células plasmáticas presentes en el timo de los ratones lúpicos producen autoanticuerpos de tipo IgG específicos contra ADN.

- El timo en los ratones lúpicos presenta una organización estructural alterada, donde no se distinguen zonas delimitadas de corteza tímica y de médula. Interesantemente presenta estructuras foliculares de tipo centro germinal.

- Los linfocitos T foliculares del timo de ratones lúpicos activan *in vitro* a los linfocitos B tímicos a niveles similares que los linfocitos T foliculares del bazo.

- Los linfocitos B del timo de ratones lúpicos inducen *in vitro* la diferenciación de los timocitos a linfocitos T foliculares, a diferencia de los linfocitos B provenientes del timo de ratones controles.

7. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a concluir que la acumulación de linfocitos B en el timo de ratones lúpicos participaría en la expansión de linfocitos T foliculares en este órgano, los que a su vez podrían favorecer la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas autorreactivas. En resumen, nuestros resultados sugieren que el timo constituye un nicho que promueve la mantención de la respuesta humoral autoinmune durante el desarrollo del lupus en un modelo murino.

8. BIBLIOGRAFÍA

Agus, D.B., Surh, C.D., and Sprent, J. (1991). Reentry of T cells to the adult thymus is restricted to activated T cells. *J. Exp. Med.* *173*, 1039–1046.

Akashi, K., Richie, L.I., Miyamoto, T., Carr, W.H., and Weissman, I.L. (2000). B lymphopoiesis in the thymus. *J. Immunol.* *164*, 5221–5226.

Alfonso, C., McHeyzer-Williams, M.G., and Rosen, H. (2006). CD69 down-modulation and inhibition of thymic egress by short- and long-term selective chemical agonism of sphingosine 1-phosphate receptors. *Eur. J. Immunol.* *36*, 149–159.

Andrew, D., and Aspinall, R. (2002). Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production. *Exp. Gerontol.* *37*, 455–463.

Aringer, M., Dörner, T., Leuchten, N., and Johnson, S.R. (2016). Toward new criteria for systemic lupus erythematosus—a standpoint. *Lupus* *25*, 805–811.

Aw, D., and Palmer, D.B. (2011). The Origin and Implication of Thymic Involution. *2*, 437–443.

Baaten, B.J.G., Li, C.R., and Bradley, L.M. (2010). Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Commun. Integr. Biol.* *3*, 508–512.

Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* *38*, 596–605.

Berrih-Aknin, S., Ragheb, S., Le Panse, R., and Lisak, R.P. (2013). Ectopic germinal centers, BAFF and anti-B-cell therapy in myasthenia gravis. *Autoimmun. Rev.* *12*, 885–893.

Bezalel, S., Guri, K.M., Elbirt, D., Asher, I., and Stoecker, Z.M. (2014). Type I interferon signature in systemic lupus erythematosus. *Isr. Med. Assoc. J.* *16*, 246–249.

Blokland, L.M., Hillen, M., Kruize, A., Meller, S., Homey, B., Smithson, G., and Radstake, T. (2017). Elevated CCL25 and CCR9-Expressing T Helper Cells in Salivary Glands of Primary Sjögren’s Syndrome Patients: Potential New Axis in Lymphoid Neogenesis. *Arthritis Rheumatol.* *69*, 2038–2051.

Bozzolo, E., Bellone, M., Quaroni, N., Voci, C., and Sabbadini, M. (2000). Thymoma associated with systemic lupus erythematosus and immunologic abnormalities. *Lupus* *9*, 151–154.

Bromley, S.K., Yan, S., Tomura, M., Kanagawa, O., and Luster, A.D. (2013). Recirculating Memory T Cells Are a Unique Subset of CD4+ T Cells with a Distinct Phenotype and Migratory Pattern. *J. Immunol.* *190*, 970–976.

Carl, J.W., Liu, J.-Q., Joshi, P.S., El-Omrani, H.Y., Yin, L., Zheng, X., Whitacre, C.C., Liu, Y., and Bai, X.-F. (2008). Autoreactive T Cells Escape Clonal Deletion in the Thymus by a CD24-Dependent Pathway. *J. Immunol.* *181*, 320–328.

Cavanagh, L.L., and Von Andrian, U.H. (2002). Travellers in many guises: The origins and destinations of dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* *80*, 448–462.

Chang, S., Yang, L., Moon, Y.M., Cho, Y.G., Min, S.Y., Kim, T.J., Kim, Y.J., Patrick, W., Kim, H.-Y., and Mohan, C. (2009). Anti-nuclear antibody reactivity in lupus may be partly hard-wired into the primary B-cell repertoire. *Mol. Immunol.* *46*, 3420–3426.

Cheng, Q., Mumtaz, I.M., Khodadadi, L., Radbruch, a., Hoyer, B.F., and Hiepe, F. (2013). Autoantibodies from long-lived “memory” plasma cells of NZB/W mice drive immune complex nephritis. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 2011–2017.

Coder, B.D., Wang, H., Ruan, L., and Su, D.-M. (2015). Thymic Involution Perturbs Negative Selection Leading to Autoreactive T Cells That Induce Chronic Inflammation. *J. Immunol.* *194*, 5825–5837.

Coder, B.D., Wang, H., and Ruan, L. (2016). Thymic Involution Perturbs Negative Selection Leading to Autoreactive T Cells That Induce Chronic Inflammation.

Cortini, A., Ellinghaus, U., Malik, T.H., Cunninghame Graham, D.S., Botto, M., and Vyse, T.J. (2017). B cell OX40L supports T follicular helper cell development and contributes to SLE pathogenesis. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 2095–2103.

Cravens, P.D., and Lipsky, P.E. (2002). Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol. Cell Biol.* *80*, 497–505.

Drennan, M.B., Franki, A.-S., Dewint, P., Van Beneden, K., Seeuws, S., van de Pavert, S. a, Reilly, E.C., Verbruggen, G., Lane, T.E., Mebius, R.E., et al. (2009). Cutting Edge: The Chemokine Receptor CXCR3 Retains Invariant NK T Cells in the Thymus. *J. Immunol.* *054096*, 8–11.

Elgueta, R., Benson, M.J., Vries, V.C. De, and Noelle, R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40 / CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* *229*, 152–172.

Feng, C., Woodside, K.J., Vance, B. a, El-Khoury, D., Canelles, M., Lee, J., Gress, R., Fowlkes, B.J., Shores, E.W., and Love, P.E. (2002). A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int. Immunol.* *14*, 535–544.

Ferrero, I., Anjuère, F., Martín, P., Martínez del Hoyo, G., Fraga, M.L., Wright, N., Varona, R., Márquez, G., and Ardavín, C. (1999). Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection. *Eur. J. Immunol.* *29*, 1598–1609.

Frommer, F., and Waisman, A. (2010). B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4+ T cells. *PLoS One* *5*, e15372.

Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 309–322.

Gesheva, V., Kerekov, N., Nikolova, K., Mihaylova, N., Todorov, T., Nikolova, M., and Tchorbanov, A. (2014). Suppression of dsDNA-specific B lymphocytes reduces disease symptoms in SCID model of mouse lupus. *Autoimmunity* *6934*, 1–11.

Gossel, G., Hogan, T., Cownden, D., Seddon, B., and Yates, J. (2017). Memory CD4 T cell subsets are kinetically heterogeneous and replenished from naive T cells at high levels. *Elife* *10*, 1–29.

Gottschalk, T.A., Tsantikos, E., Hibbs, M.L., and Harris, J. (2015). Pathogenic inflammation and its therapeutic targeting in systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* *6*, 1–14.

Hara, Y., Tashiro, Y., Murakami, A., Nishimura, M., Shimizu, T., Kubo, M., Burrows, P.D., and Azuma, T. (2015). High affinity IgM⁺ memory B cells are generated through a germinal center-dependent pathway. *Mol. Immunol.* *68*, 617–627.

Hardy, C.L., Godfrey, D.I., and Scollay, R. (2001). The effect of antigen stimulation on the migration of mature T cells from the peripehral lymphoid tissues to the thymus. *8*, 123–131.

Hodge, D.L., Reynolds, D., Cerbán, F.M., Correa, S.G., Baez, N.S., Young, H. a, and Rodriguez-Galan, M.C. (2012). MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes. *Eur. J. Immunol.* *42*, 2644–2654.

Ishikawa, S., and Matsushima, K. (2007). Aberrant B1 cell trafficking in lupus. *Front. Biosci.* 1790–1803.

Jost, S.A., Tseng, L.-C., Matthews, L.A., Vasquez, R., Zhang, S., Yancey, K.B., and Chong, B.F. (2014). IgG, IgM, and IgA Antinuclear Antibodies in Discoid and Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Sci. World J.* 2014, 1–7.

Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 833–844.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K. a (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 14, 377–391.

Kuchen, S., Robbins, R., Sims, G.P., Sheng, C., Phillips, T.M., Lipsky, P.E., and Ettinger, R. (2007). Essential Role of IL-21 in B Cell Activation, Expansion, and Plasma Cell Generation during CD4+ T Cell-B Cell Collaboration. *J. Immunol.* 179, 5886–5896.

Lacotte, S., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2009). CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173, 310–317.

Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* 206, 607–622.

Li, Y., Lee, P.Y., and Reeves, W.H. (2010). Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 58, 355–364.

Linton, P.J., and Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* 5, 133–139.

Lynch, H.E., Goldberg, G.L., Chidgey, A., Brink, M.R.M. Van Den, Boyd, R., and Sempowski, G.D. (2009). NIH Public Access. *Trends Immunol.* 30, 366–373.

Mackall, C.L., Fry, T.J., and Gress, R.E. (2011). Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 330–342.

Mackay, I.R., and Smalley, M. (1966). Results of thymectomy in systemic lupus erythematosus: observations on clinical course and serological reactions. *Clin. Exp. Immunol.* 1, 129–138.

Marx, A., Pfister, F., Schalke, B., Saruhan-Direskeneli, G., Melms, A., and Ströbel, P. (2013). The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmun. Rev.* 12, 875–884.

McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., and McHeyzer-Williams, L. (2012). Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 24–34.

MINSAL (2013). Guía Clínica AUGE Lupus Eritematoso Sistémico. Minist. Salud, Gob. Chile, Santiago.

Mori, S., Sugihara, A., Taketani, S., Doi, H., and Fukuba, Y. (1997). Cell Progenitors in the Thymus.

Morikawa, H., and Sakaguchi, S. (2014). Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function : from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *25*, 192–205.

Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., et al. (2007). Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3008–3022.

Nuñez, S., Moore, C., Gao, B., Rogers, K., Hidalgo, Y., del Nido, P.J., Restaino, S., Naka, Y., Bhagat, G., Madsen, J.C., et al. (2016). The human thymus perivascular space is a functional niche for viral-specific plasma cells. *Sci. Immunol.* *1*, eaah4447.

Ohl, K., and Tenbrock, K. (2011). Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*.

Okumura, M., Ohta, M., Takeuchi, Y., Shiono, H., Inoue, M., Fukuhara, K., Kadota, Y., Miyoshi, S., Fujii, Y., Matsuda, H., et al. (2003). The immunologic role of thymectomy in the treatment of myasthenia gravis: Implication of thymus-associated B-lymphocyte subset in reduction of the anti-acetylcholine receptor antibody titer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *126*, 1922–1928.

Palmer, D.B. (2013). The effect of age on thymic function. *Front. Immunol.* *4*, 1–6.

Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 383–391.

Perera, J., Meng, L., Meng, F., and Huang, H. (2013). Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 17011–17016.

Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., and Morel, L. (2011). Murine models of systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 271694.

Pieterse, E., and van der Vlag, J. (2014). Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* *5*, 164.

Prelog, M. (2006). Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmun. Rev.* *5*, 136–139.

Proietto, A.I., Dommelen, S. Van, Zhou, P., Rizzitelli, A., Amico, A.D., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., et al. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *105*.

Romagnani, P., Annunziato, F., Lazzeri, E., Cosmi, L., Beltrame, C., Lasagni, L., Galli, G., Francalanci, M., Manetti, R., Marra, F., et al. (2001). Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) $\alpha\beta$ +CD8+ single-positive T cells, TCR $\gamma\delta$ + T cells, and. *Blood* *97*, 601–607.

Romi, F. (2011). Thymoma in Myasthenia Gravis: From Diagnosis to Treatment. *Autoimmune Dis.* *2011*, 1–5.

Sato, T., Ishikawa, S., Akadegawa, K., Ito, T., Yurino, H., Kitabatake, M., Yoneyama, H., and Matsushima, K. (2004). Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. *Eur. J. Immunol.* *34*, 3346–3358.

Sauce, D., and Appay, V. (2011). Altered thymic activity in early life: How does it affect the immune system in young adults? *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 543–548.

Shelly, S., Agmon-Levin, N., Altman, A., and Shoenfeld, Y. (2011). Thymoma and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* *8*, 199–202.

Shin, H., and Akiko, I. (2013). Tissue resident T cells. *Immunol. Rev.* *255*, 165–181.

Shinall, S.M., Gonzalez-Fernandez, M., Noelle, R.J., and Waldschmidt, T.J. (2000). Identification of Murine Germinal Center B Cell Subsets Defined by the Expression of Surface Isotypes and Differentiation Antigens. *J. Immunol.* *164*, 5729–5738.

Shortman, K., Heath, W.R., and Cd, T. (2010). The CD8 + dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* *18–31*.

Stevi, S., Gliši, B., and Dedovi, J. (2017). Systemic lupus erythematosus and thymus persistens – A case report. *Vojnosanit Pregl.* *74*, 699–702.

Takeo, M., Nagafuchi, H., Kaneko, S., Wakisaka, S., Oneda, K., Takeba, Y., Yamashita, N., Suzuki, N., Kaneoka, H., and Sakane, T. (1997). Autoreactive T cell clones from patients with systemic lupus erythematosus support polyclonal autoantibody production. *J. Immunol.* *158*, 3529–3538.

Tanaka, Y., Kubo, S., Iwata, S., Yoshikawa, M., and Nakayamada, S. (2018). B cell phenotypes, signaling and their roles in secretion of antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* *186*, 21–25.

Tatari-Calderone, Z., Stojakovic, M., Dewan, R., Le Boudier, G., Jankovic, D., and Vukmanovic, S. (2012). Age-related accumulation of T cells with markers of relatively stronger autoreactivity leads to functional erosion of T cells. *BMC Immunol.* *13*, 8.

Taylor, J.J., Jenkins, M.K., and Pape, K. a (2012a). Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. *Trends Immunol.* *33*, 590–597.

Taylor, J.J., Pape, K. a, and Jenkins, M.K. (2012b). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* *209*, 597–606.

Teng, F., Zhou, Y., Jin, R., Chen, Y., Pei, X., Liu, Y., Dong, J., Wang, W., Pang, X., Qian, X., et al. (2011). The molecular signature underlying the thymic migration and maturation of TCR $\alpha\beta$ + CD4+ CD8 thymocytes. *PLoS One* *6*, e25567.

Thorpe, R.B., Gray, A., Kumar, K.R., Susa, J.S., and Chong, B.F. (2014). Site-specific analysis of inflammatory markers in discoid lupus erythematosus skin. *Sci. World J.* *2014*.

Ugarte-Gil, M.F., and Alarcón, G.S. (2014). Systemic lupus erythematosus: a therapeutic challenge for the XXI century. *Clin. Rheumatol.* *33*, 441–450.

Walters, S.N., Webster, K.E., Daley, S., and Grey, S.T. (2014). A role for intrathymic B cells in the generation of natural regulatory T cells. *J. Immunol.* *193*, 170–176.

Wang, W., Rangel-Moreno, J., Owen, T., Barnard, J., Nevarez, S., Ichikawa, H.T., and Anolik, J.H. (2014). Long-term B cell depletion in murine lupus eliminates autoantibody-secreting cells and is associated with alterations in the kidney plasma cell niche. *J. Immunol.* *192*, 3011–3020.

Weinreich, M., and Hogquist, K. (2008). Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J Immunol* *181*, 2265–2270.

Wen, Z., Xu, L., Xu, W., and Xiong, S. (2012). Production of anti-double-stranded DNA

antibodies in activated lymphocyte derived DNA induced lupus model was dependent on CD4+ T cells. *Lupus* 21, 508–516.

Wilk, M.M., Misiak, A., McManus, R.M., Allen, A.C., Lynch, M.A., and Mills, K.H.G. (2017). Lung CD4 Tissue-Resident Memory T Cells Mediate Adaptive Immunity Induced by Previous Infection of Mice with *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* 199, 233–243.

Xiao, S., Zhang, W., and Manley, N.R. (2018). Thymic B cell development is controlled by the B potential of progenitors via both hematopoietic-intrinsic and thymic microenvironment-intrinsic regulatory mechanisms. *PLoS One* 13, 1–19.

Xing, C., Zhu, G., Xiao, H., Fang, Y., Liu, X., Han, G., Chen, G., Hou, C., Shen, B., Li, Y., et al. (2017). B cells regulate thymic CD8 + T cell differentiation in lupus-prone mice. *Oncotarget* 8, 89486–89499.

Yamano, T., Nedjic, J., Hinterberger, M., Steinert, M., Koser, S., Pinto, S., Gerdes, N., Lutgens, E., Ishimaru, N., Busslinger, M., et al. (2015). Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity* 42, 1048–1061.

Yang, J., Lin, X., Pan, Y., Wang, J., Chen, P., Huang, H., Xue, H.H., Gao, J., and Zhong, X.P. (2016). Critical roles of mTOR complex 1 and 2 for t follicular helper cell differentiation and germinal center responses. *Elife* 5, 1–22.

Yap, D.Y.H., and Lai, K.N. (2013). The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - From bench to bedside. *Nephrology* 18, 243–255.

Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201, 703–711.

Zhang, C.-J., Gong, Y., Zhu, W., Qi, Y., Yang, C.-S., Fu, Y., Chang, G., Li, Y., Shi, S., Wood, K., et al. (2016). Augmentation of Circulating Follicular Helper T Cells and Their Impact on Autoreactive B Cells in Myasthenia Gravis. *J. Immunol.*

Zhang, M., Srivastava, G., and Lu, L. (2004). The Pre-B Cell Receptor and Its Function during B Cell Development. *1*, 89–94.

Zlotoff, D.A., Sambandam, A., Logan, T.D., Bell, J.J., and Schwarz, B.A. (2010). CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *115*, 1897–1905.

Zuckerman, N.S., Howard, W. a, Bismuth, J., Gibson, K., Edelman, H., Berrih-Aknin, S., Dunn-Walters, D., and Mehr, R. (2010). Ectopic GC in the thymus of myasthenia gravis

patients show characteristics of normal GC. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1150–1161.