

UCH-FC  
MAG-B  
C 932  
C 1

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE POSTGRADO



**"PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN EL ESTABLECIMIENTO DE AUTOINMUNIDAD EN EL LUPUS"**

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

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile  
Por

**NATALIA PÍA CRISÓSTOMO TORO**

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

Santiago, 2014

ESCUELA DE POSTGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE  
UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE POSTGRADO

*El hombre que ha perdido la  
facultad de maravillarse es  
como un hombre muerto*

*Albert Einstein  
(1879-1955)*

## BIOGRAFÍA



Nací un miércoles 10 de junio del año 1987, en Santiago, Chile. Desde pequeña me interesó el mundo natural y mi curiosidad me llevó durante mis años de colegio a dedicarme al área de la biología. Luego el año 2006 ingresé a Bachillerato en la Universidad de Chile y emprendí mi camino en busca de una carrera que me forjara como investigadora. Así ingresé a Ingeniería en Biotecnología Molecular y luego de cursar el ramo de Inmunología en el año 2010, desarrollé un gran interés por esta área, atendida su gran proyección en el campo de la medicina y el desafío que implica llegar a descubrir medios para la cura y tratamiento de enfermedades. De esta manera a fines de dicho año ingresé al laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias a cargo de la Dra. María Rosa Bono. Luego de mi titulación decidí continuar mis estudios por lo que el año 2012 ingresé al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la misma Universidad. Durante estos dos años de ciencia ardua he aprendido a desempeñarme como profesional, enfrentando problemas y superando obstáculos, aprendiendo a tener paciencia y perseverar.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente a todos los que me apoyaron durante la realización de esta tesis.

A la Dra. María Rosa Bono por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Inmunología, permitirme desarrollarme como científica y depositar su confianza en mí.

A los Drs. Mario Roseblatt y Daniela Sauma por aportar con sugerencias y consejos durante las reuniones de laboratorio.

Mi respeto y agradecimiento a los ratoncitos de laboratorio, sin ellos la ciencia no avanzaría.

Al inmunolab por compartir a diario y hacer del trabajo un lugar ameno al cual asistir. En especial al Leito por su alegría, cariño, conocimientos y absoluta disposición a ayudar. A los amigos que continuaron el mismo camino del magíster, Vale y Coté, gracias por compartir discusiones de vida del ámbito científico y las infaltables copuchas. A los "niños", Cony, Domi y Felipe, por inyectar energías renovadoras al inmunolab. A las demás grandes científicas del laboratorio; Gaby, Yessia, Sarah, Pauli, Paula, por la simpatía y compañía. A Camila por ser la segunda integrante del team lupus con quien trabajamos hasta horas impensables. A Paz por las interminables horas de sorting y por último a la Pame, Zoila y Óscar por la buena disposición y cariño.

Agradezco a CONICYT por el aporte entregado mediante su beca nacional de magíster.

Finalmente agradecer a mi familia, en especial a mis padres, quienes me han dado su apoyo incondicional durante toda esta larga travesía. Gracias por el amor, paciencia y confianza, espero no defraudarlos nunca y les agradezco infinitamente su apoyo en todas mis decisiones de vida.

*Le agradezco a la vida por darme el don de la curiosidad y a la naturaleza que nunca deja de sorprenderme.*

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado a través de los proyectos FONDECYT 1100557, 1100448, AT24100212, CONICYT PFB-16 y Beca Magister 2012 CONICYT.

## ÍNDICE

BIOGRAFÍA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
FINANCIAMIENTO .....	v
ÍNDICE .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1. Autoinmunidad .....	5
1.2. Lupus Eritematoso Sistémico (LES) .....	5
1.3. Alteraciones Inmunológicas en el LES.....	7
1.3.1. Auto-anticuerpos en el LES .....	7
1.3.2. Citoquinas en el LES.....	8
1.3.3. Disfunción linfocitaria en el LES.....	10
1.3.4. Células Dendríticas y LES .....	12
1.3.5. Tolerancia Central, DCs y LES .....	16
1.4. Modelo murino de lupus: BWF1.....	20
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	21
2.1. HIPÓTESIS .....	21

2.2. OBJETIVO GENERAL .....	21
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. MATERIALES .....	23
3.1.1. Animales .....	23
3.1.2. Anticuerpos .....	24
3.1.3. Equipos .....	24
3.1.4. Programas.....	25
3.2. MÉTODOS .....	26
3.2.1. Obtención de suero a partir de sangre de ratones.....	26
3.2.2. ELISA para la detección de anticuerpos anti-ADN doble hebra .....	26
3.2.3. Aislamiento de células de médula ósea, linfonodos, bazo y timo. ....	27
3.2.4. Purificación magnética de DCs de bazo .....	28
3.2.5. Purificación magnética de LB de bazo.....	29
3.2.6. Purificación de diferente sub-poblaciones celulares mediante <i>cell sorter</i> .29	
3.2.7. Citometría de flujo para marcadores de superficie en linfocitos provenientes de órganos linfoides. ....	31
3.2.8. Citometría de flujo para marcadores de superficie en linfocitos sanguíneos.....	32
3.2.9. Citometría de flujo para la detección intracelular de citoquinas y factores de transcripción.....	32
3.2.10. Ensayo de Apoptosis celular .....	34
3.2.11. Ensayos de Migración Competitiva.....	35
3.2.12. Co-cultivo de sub-poblaciones de DCs de timo con timocitos .....	36

3.2.13. Detección de citoquinas en sobrenadantes y suero .....	38
3.2.14. Transferencia adoptiva de DCs de bazo de ratones control o lúpico a ratones prelúpicos.....	38
3.2.15. Co-cultivo de LB de bazo de ratones prelúpicos con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. ....	40
3.2.16. Análisis Estadístico .....	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1. DCs del bazo de ratones lúpicos presentan alteraciones fenotípicas y homeostáticas.....	42
4.2. DCs de la periferia migran al timo durante el desarrollo del LES alterando la homeostasis tímica. ....	54
4.3. Rol <i>in vivo</i> de las DCs durante el LES: Transferencia adoptiva de DCs de bazo de ratones controles o lúpicos a ratones prelúpicos.....	72
4.4. DCs del bazo de ratones lúpicos inducen la maduración de Linfocitos B <i>in vitro</i> .....	88
5. DISCUSIÓN .....	90
6. RESUMEN DE RESULTADOS.....	104
7. CONCLUSIÓN .....	105
8. BIBLIOGRAFIA .....	106



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Metodología experimental de la transferencia adoptiva de DCs de bazo de ratones lúpicos o controles en ratones prelúpicos.	40
Figura 2.	El bazo de ratones lúpicos presenta un aumento en el porcentaje y número absoluto de DCs en comparación a ratones prelúpicos y controles.	44
Figura 3.	Las pDC de bazo de ratones lúpicos poseen un fenotipo característico de células productoras de IFN- $\alpha$ (CCR9 <sup>+</sup> PDCA-1 <sup>-</sup> Siglech <sup>-</sup> CD9 <sup>+</sup> ).	46
Figura 4.	Las pDC CCR9 <sup>+</sup> PDCA-1 <sup>-</sup> presentan un mayor estado de activación comparado a pDC CCR9 <sup>+</sup> PDCA-1 <sup>+</sup> .	48
Figura 5.	Las pDC CCR9 <sup>+</sup> PDCA-1 <sup>-</sup> muestran una mayor resistencia a la apoptosis en comparación a pDC CCR9 <sup>+</sup> PDCA-1 <sup>+</sup> y cDC.	49
Figura 6.	Las DCs del bazo de ratones lúpicos tienen una mayor capacidad migratoria en comparación a DCs de bazo de ratones controles.	52
Figura 7.	Ratones lúpicos presentan timos con baja celularidad acompañado de un aumento en el porcentaje de DCs totales.	56
Figura 8.	El aumento del porcentaje de DCs en el timo de ratones lúpicos se debe a la expansión de DCs convencionales (cDC) y plasmocitoides (pDC).	57
Figura 9.	Las pDC de timo de ratones lúpicos poseen un fenotipo característico de células productoras de IFN- $\alpha$ (CCR9 <sup>+</sup> PDCA-1 <sup>-</sup> Siglech <sup>-</sup> CD9 <sup>+</sup> ).	59
Figura 10.	Las cDC de timo de ratones lúpicos poseen un fenotipo característico de células migratorias provenientes de la periferia (Sirpa <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> ).	61
Figura 11.	cDC del timo de ratones lúpicos poseen el mismo fenotipo que las	62

cDC del bazo.

- Figura 12. Células dendríticas (DCs) provenientes del timo de ratones lúpicos presentan un fenotipo hiperactivado comparado a DCs de ratones prelúpicos y controles. 64
- Figura 13. La baja celularidad del timo de ratones lúpicos se debe a la pérdida de LT inmaduros ( $CD4^+CD8^+$ ). 66
- Figura 14. El timo de ratones lúpicos presenta un mayor porcentaje de LTregs comparado a ratones controles y prelúpicos. 68
- Figura 15. DCs del timo de ratones lúpicos impiden la selección positiva de LT DP a LT  $CD8^+$  SP. 69
- Figura 16. DCs provenientes del timo de ratones lúpicos poseen una mayor capacidad de generar LTreg a partir de timocitos de un ratón control en comparación a DCs de timo de ratones controles. 71
- Figura 17. Patrón de citoquinas obtenidos de los cultivos de timocitos de ratones controles con DCs de timo de ratones lúpicos y controles. 72
- Figura 18. DCs de bazo de ratones lúpicos inducen la producción de auto-anticuerpos contra ADNdh en ratones prelúpicos. 74
- Figura 19. DCs de bazo de ratones lúpicos inducen un aumento en el tiempo de los Linfocitos B totales (LB), LB  $CD5^+$  y DCs totales en sangre de ratones prelúpicos. 75
- Figura 20. El aumento de LB totales, LB  $CD5^+$  y DCs totales inducido por la transferencia adoptiva de DCs de bazo de ratones es un fenómeno que se observa en sangre de ratones lúpicos. 76
- Figura 21. Patrón de citoquinas obtenidos a partir del suero de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. 78
- Figura 22. El bazo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos presenta un aumento en el porcentaje y número

absoluto de DCs.

- Figura 23. El bazo de ratones prelápicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos presenta una disminución de LB vírgenes y un aumento de LB IgM<sup>+</sup> y LB CD5<sup>+</sup>. 82
- Figura 24. El bazo de ratones prelápicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos presenta un aumento de los LT totales y LT productores de IFN- $\gamma$ . 84
- Figura 25. El timo de ratones prelápicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos presenta una disminución en el porcentaje de DCs. 86
- Figura 26. El timo de ratones prelápicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos presenta un repertorio normal de LT. 88
- Figura 27. DCs del bazo de ratones lúpicos interactúan directamente con LB para gatillar la disminución de LB vírgenes y la baja expresión de MHC-II. 90

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	: Ácido desoxiribonucleico
<b>ADNdh</b>	: ADN de doble hebra
<b>ANA</b>	: Anticuerpo Antinuclear
<b>APC</b>	: Célula presentadora de antígeno ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
<b>BSA</b>	: Seroalbúmina de bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>cDC</b>	: Células dendríticas convencionales ( <i>Conventional Dendritic Cells</i> )
<b>pDC</b>	: Células dendríticas plasmocitoides ( <i>Plasmacytoid Dendritic Cells</i> )
<b>DCs</b>	: Células Dendríticas ( <i>Dendritic Cells</i> )
<b>DP</b>	: Doble Positiva
<b>EDTA</b>	: Ácido etilendiaminotetraacético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ELISA</b>	: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i> )
<b>FBS</b>	: Suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FITC</b>	: Isotiocianato de Fluoresceína ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
<b>FMO</b>	: Control de Fluorescencia en Citometría de Flujo ( <i>Fluorescence Minus One</i> )
<b>Foxp3</b>	: Factor de transcripción forkhead caja P3 ( <i>Forkhead box P3</i> )
<b>Igs</b>	: Inmunoglobulinas
<b>IH</b>	: Índice de Homing
<b>IL</b>	: Interleuquina
<b>IMDM</b>	: Medio Dulbecco Modificado Iscove ( <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> )
<b>IMF</b>	: Intensidad Media de Fluorescencia
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	: Interferon alfa

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: Interferon gamma
<b>IPCs</b>	: Células Productoras de IFN ( <i>IFN Producing Cells</i> )
<b>LB</b>	: Linfocito B
<b>LES</b>	: Lupus Eritematoso Sistémico
<b>LT</b>	: Linfocito T
<b>LTreg</b>	: Linfocito T Regulador
<b>MHC</b>	: Complejo Principal de Histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
<b>MLN</b>	: Linfonodo mesentérico ( <i>Mesenteric Lymph Node</i> )
<b>MO</b>	: Médula Ósea
<b>NZB</b>	: New Zealand Black
<b>NZW</b>	: New Zealand White
<b>(NZB/W) F1 o BWF1</b>	: Primera generación de crías de una cruce entre ratones NZB y NZW
<b>PBS</b>	: Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<b>PI</b>	: Yoduro de Propidio ( <i>Propidium Iodide</i> )
<b>PLN</b>	: Linfonodo periférico ( <i>Peripheral Lymph Node</i> )
<b>PMA</b>	: Acetato de Forbol Miristato ( <i>Phorbol Myristate Acetate</i> )
<b>RPMI</b>	: Medio Instituto Memorial Roswell Park ( <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> )
<b>SP</b>	: Single Positiva
<b>TRITC</b>	: Isotiocianato de tetrametilrodamina ( <i>Tetramethylrhodamine isothiocyanate</i> )

## RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por un aumento en la producción de auto-anticuerpos que se depositan en los tejidos causando inflamación. Se reconoce que los LB auto-reactivos son los mediadores clave de la inflamación durante el desarrollo del lupus, sin embargo las células dendríticas (DCs) cumplen un rol fundamental en la regulación de tolerancia e inmunidad. Dicha regulación se encuentra mediada por interacciones tanto con linfocitos T (LT) como linfocitos B (LB). Debido a esto, las DCs han sido implicadas en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes y particularmente en el LES. En este trabajo se postula que durante el desarrollo del lupus las DCs presentarían características fenotípicas y funcionales distintivas que les permitirían gatillar la hiperactivación de LT y LB y promover una respuesta humoral. Utilizando ratones (NZWxNZB) F1 como modelo murino para LES, encontramos que en el bazo existe un incremento anormal en el número de DCs, tanto convencionales (cDC) como plasmocitoides (pDC). La caracterización fenotípica de las pDC del bazo de ratones lúpicos muestra que las pDC son responsables de la producción de IFN- $\alpha$ , una característica típica del LES. Ensayos de apoptosis sugieren que las pDC tienen una mayor sobrevivencia en comparación a cDCs, lo que permitiría explicar en parte su acumulación en el bazo de los ratones lúpicos. Análisis de citometría de flujo demostraron que las células dendríticas de ratones lúpicos presentan un fenotipo hiperactivado, caracterizado por una sobre expresión de distintas moléculas co-estimuladoras. Ensayos de migración competitivos demostraron que las DCs provenientes de un ratón lúpico tienen una mayor capacidad de migración que DCs de

ratones controles hacia distintos órganos linfoides. Por otro lado en el timo de ratones lúpicos encontramos un aumento de DCs y un alto porcentaje de LT reguladores (LTreg) comparado a ratones controles, lo cual sugiere que las DCs del timo de ratones lúpicos son en parte responsables de la expansión de LTreg observada. Para evaluar el rol *in vivo* de las DCs se realizaron experimentos de transferencia adoptiva de DCs obtenidas del bazo de ratones lúpicos o controles a ratones jóvenes de la cepa (NZWxNZB) F1 (prelúpicos). El desarrollo de la enfermedad fue monitoreado por la detección de auto-anticuerpos en el suero y niveles de proteinuria. La transferencia de DCs de ratones lúpicos produce un aumento en el título de auto-anticuerpos comparado a la inyección de DCs de ratones controles, sin embargo no se observaron cambios en los niveles de proteinuria. Luego de 2 meses los ratones tratados con DCs de ratones lúpicos presentaban un aumento notable de LB CD5<sup>+</sup> tanto en sangre como en el bazo, fenómeno que se observa sólo en ratones lúpicos.

Este trabajo demuestra que existe un tráfico aberrante y una acumulación anormal de DCs en diferentes tejidos durante el desarrollo del lupus. Estas observaciones podrían explicar en parte la hiperactivación de los LT y el desarrollo y sobrevida de células plasmáticas auto-reactivas responsables de la generación de auto-anticuerpos. Finalmente concluimos que las DCs cumplen un rol esencial en la iniciación, progreso y mantención del lupus.

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by increased autoantibody production that leads to multiple tissue injury. While autoreactive B lymphocytes are the key mediators of inflammation in lupus, dendritic cells (DCs) are important orchestrators of immune responses and key components in fine-tuning the balance between tolerance and immunity. This fine-tuning regulation is mediated by interactions with both T and B lymphocytes. Due to this is that DCs have been implicated in the pathogenesis of autoimmune diseases, particularly SLE. In this work we postulate that autoimmune DCs, from mice that have developed lupus, exhibit functional and phenotypic characteristics that allow them to trigger T and B cell hyperactivation and promote an exacerbated humoral response in SLE. By using the (NZWxNZB) F1 strain, murine model for SLE, we found that these mice present an abnormal expansion of DCs, both cDC and pDC, in their spleen. Phenotypic characterization of the pDC subset of lupic mice suggests that they consist specifically on IFN- $\alpha$ -producing cells. Apoptosis assays suggest that pDC have a higher viability in comparison with other DC sub-populations, which could in part explain their accumulation in the spleen of lupic mice. Flow cytometry analysis showed that splenic DCs from lupic mice present a hyper activated phenotype, characterized by the over expression of different co-stimulatory molecules. Competitive homing assays demonstrated that splenic DC from lupic mice have a greater migratory capacity towards various lymphoid organs compared to splenic DCs from control mice. On the other hand lupic mice thymus present increased DCs numbers and a higher percentages of T regulatory (Treg) cells compared to control mice which suggests that



thymic DCs from lupic mice are in part responsible for the expansion of thymic Tregs. To address the *in vivo* role of DCs during lupus we carried out adoptive transfer experiments where young pre-autoimmune (NZWxNZB) F1 mice (prelupic) were injected i.v. with splenic DCs of either control or old autoimmune (NZWxNZB) F1 mice (lupic). Progression of the disease was monitored by the detection of autoantibodies on blood serum and proteinuria levels. Splenic DCs from lupic mice produces an increase of autoantibody titers compared to the transfer of control DCs, nevertheless these mice didn't present proteinuria. After two months lupic DCs treated mice presented a significant increase of CD5<sup>+</sup> B cells in peripheral blood and spleen, a phenomenon observed only in lupic mice.

This work demonstrates the presence of an aberrant traffic and abnormal accumulation of DCs in different tissues during lupus. These observations could explain in part the hyper activation of T cells and the development and survival of auto-reactive plasma cells responsible for the generation of autoantibodies. Finally we conclude that DCs play an essential role in the initiation, progression and maintenance of lupus.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Autoinmunidad**

La capacidad del sistema inmune para diferenciar lo patogénico de lo inocuo le permite ser tolerante con las células propias y rechazar de forma específica a aquellos agentes que representen un peligro para el organismo. La incapacidad de generar una respuesta inmune produce inmunodeficiencia, mientras que una respuesta inapropiada o excesiva, genera autoinmunidad o alergia, resultando en una condición fisiopatológica que generalmente se manifiesta como una enfermedad (Kyewski & Klein 2006).

La tolerancia inmune se define como la falta de respuesta a un antígeno luego de la exposición a éste (Abbas y col. 2010). El fenómeno de autoinmunidad se genera ante la insuficiencia o pérdida de los mecanismos que normalmente mantienen la tolerancia en las poblaciones linfocitarias. La autoinmunidad puede surgir como consecuencia de una selección o regulación incorrecta de los linfocitos auto-reactivos, por la presentación de auto-antígenos en un contexto inflamatorio o la producción de neo-antígenos. Tanto la susceptibilidad genética como factores ambientales se han visto involucrados en el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad (Rioux & Abbas 2005).

### **1.2. Lupus Eritematoso Sistémico (LES)**

Aquellas enfermedades autoinmunes donde las principales células efectoras son los linfocitos B, se caracterizan por la producción de autoanticuerpos que forman inmunocomplejos los cuales son los causantes de la patología. Los

inmunocomplejos se depositan y aglomeran en diferentes tejidos, sin importar la procedencia celular de los antígenos. La enfermedad se produce porque en la medida que los inmunocomplejos son depositados, éstos producen inflamación y atraen células fagocíticas que producen daño en los tejidos (Yanaba y col. 2008).

Una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de inmunocomplejos es el lupus eritematoso sistémico (LES). El LES es una enfermedad autoinmune crónica que afecta a múltiples órganos y que se caracteriza por la presencia de linfocitos T hiperactivados y linfocitos B auto-reactivos. En esta enfermedad se producen auto-anticuerpos contra nucleoproteínas y ADN los cuales se depositan principalmente en el riñón, activan la cascada del complemento, reclutan neutrófilos, y producen un proceso inflamatorio que culmina con el daño renal (Carroll 2004). El lupus afecta aproximadamente al 0,1% de la población mundial, principalmente mujeres en edad fértil. En Chile, hasta el año 2012 se estimaba que habían entre 12.000 y 16.000 pacientes con algún tipo de lupus, estableciéndose una prevalencia de la enfermedad de 70 a 91 casos por cada 100.000 habitantes. La susceptibilidad al lupus está dada por factores genéticos, ambientales y hormonales. En humanos el lupus surge como un desorden poligénico donde las distintas combinaciones de los genes defectuosos darían origen a las diferentes manifestaciones de la enfermedad. Se atribuye un papel importante a los factores ambientales en el desarrollo del lupus ya que es necesario un evento gatillante para iniciar la enfermedad (Rahman & Isenberg 2008). Por otro lado la gran diferencia que existe en la prevalencia del lupus entre hombres y mujeres (una razón de 9:1) sugiere la activa participación de hormonas sexuales en la patogénesis de la enfermedad (Rahman & Isenberg 2008).

El lupus es una enfermedad que no tiene cura y los tratamientos actuales son solo paliativos y difieren de un paciente a otro, dependiendo de cuáles son los principales síntomas a tratar. En general los tratamientos involucran terapia con corticoesteroides y agentes inmunosupresores, y por último quimioterapias inmunoablativas con trasplante de médula ósea con el objetivo de generar un sistema inmune no susceptible a la enfermedad (Wentworth & Davies 2009).

### **1.3. Alteraciones Inmunológicas en el LES**

El lupus es una enfermedad del sistema inmune caracterizada por complejas interacciones entre LB auto-reactivos, LT hiperactivados y DCs disfuncionales. Estas interacciones dan lugar a la producción de una amplia gama de citoquinas inflamatorias, células apoptóticas y diversos auto-anticuerpos que forman inmunocomplejos. A su vez, los inmunocomplejos activan células efectoras y al sistema del complemento, lo que lleva finalmente al daño e inflamación tisular que son la característica principal de esta enfermedad. Debido a esto, pacientes con LES presentan un aumento de citoquinas inflamatorias y auto-anticuerpos. Además el lupus ha sido relacionado con deficiencias en genes involucrados en la respuesta inmune, apoptosis, transducción de señales y el ciclo celular (Rahman & Isenberg 2008).

#### **1.3.1. Auto-anticuerpos en el LES**

Una de las características principales del lupus es la presencia de un amplio espectro de auto-anticuerpos contra una variedad de auto-antígenos. Los

auto-antígenos que gatillan esta respuesta humoral provienen principalmente de componentes intracelulares como el ADN, histonas, ARN, ribonucleoproteínas, cromatina, nucleosomas entre otros (Marks & Tullus 2012). Los auto-anticuerpos contra estos antígenos, también llamados ANA (anticuerpos anti-nucleares), son producidos por células plasmáticas auto-reactivas que presentan un fenotipo hiperactivado. Esta excesiva activación se refleja en los más de 100 auto-anticuerpos descritos hasta el momento en el LES. Los anticuerpos según su isotipo, pueden ejercer distintos efectos ya sea por agregación, bloqueo, estimulación, opsonización, fijación del complemento o sensibilización de otras células efectoras del sistema inmune (Naparstek & Plotz 1993). La prevalencia de auto-anticuerpos en el suero de pacientes con lupus es variable, sin embargo la presencia de auto-anticuerpos contra ADN de doble hebra (ADNdh) pareciera ser el diagnóstico más claro para el LES dado que existe una correlación directa entre el título de este anticuerpo y el desarrollo de la enfermedad (Naparstek & Plotz 1993; Rahman & Isenberg 2008; Marks & Tullus 2012).

### **1.3.2. Citoquinas en el LES**

Las citoquinas son un grupo de proteínas y péptidos solubles que son producidos y secretados por células del sistema inmune. Éstas actúan como reguladoras positivas y negativas del sistema inmune, modulando así las actividades funcionales de las células como la diferenciación, maduración y activación (Urra & Torre 2012). Se postula que la desregulación de citoquinas cumpliría un rol crucial en la pérdida de la tolerancia que da lugar a la enfermedad

y a su vez en el daño tisular que la caracteriza, por ende las citoquinas participarían tanto en la iniciación como en la mantención del LES. La principal citoquina involucrada en la patogénesis del lupus es IFN- $\alpha$ , sin embargo otras citoquinas que también se encuentran desreguladas en el LES son IL-6, IFN- $\gamma$ , y citoquinas producidas por LT como IL-17, IL-21 e IL-2 (Ohl & Tenbrock 2011). En el suero de pacientes con LES se puede correlacionar niveles altos de IFN- $\alpha$  con la producción de auto-anticuerpos anti-ADNdh y con el desarrollo de la enfermedad. IFN- $\alpha$  es producido principalmente por células dendríticas plasmocitoides (pDC) y se ha determinado que éstas son capaces de secretar esta citoquina luego de entrar en contacto con complejos inmunes. Se ha determinado que IFN- $\alpha$  cumpliría múltiples funciones en la patogénesis del LES. Por una parte éste promueve una retroalimentación positiva haciendo que las pDC, monocitos y células dendríticas convencionales (cDC) sintetizen IFN de tipo I (Obermoser & Pascual 2010). A su vez IFN- $\alpha$  promueve la pérdida de la tolerancia periférica al inducir la maduración de DCs, dado que se requiere de la presencia de DCs inmaduras para la generación de Linfocitos T reguladores (LTreg) así como para la delección de LT auto-reactivos (Blanco y col. 2001). Por último IFN- $\alpha$  promueve la citotoxicidad de LT CD8<sup>+</sup> y también es capaz de aumentar la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> auto-reactivos al inducir una mayor expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de células presentadoras de antígeno (Ohl & Tenbrock 2011).

### 1.3.3. Disfunción linfocitaria en el LES

Hoy en día se sabe que las enfermedades autoinmunes como el lupus se producen debido a la interacción entre múltiples componentes del sistema inmune, donde LT hiperactivados facilitan la respuesta inmune adaptable de LB auto-reactivos y a su vez los LB son capaces de tener un rol recíproco en la activación de LT CD4<sup>+</sup> (Tobón y col. 2013). Los LB son esenciales en la patogénesis del lupus sin embargo, estos no son simplemente células productoras de anticuerpos. Utilizando al modelo murino de lupus MRL/lpr, Shlomchik y col. introdujeron un mutación en los LB de estos ratones, la cual imposibilita la secreción de inmunoglobulinas (y autoanticuerpos) y demostraron que los ratones aun así desarrollaban nefritis y vasculitis (Chan y col. 1999). Dicho experimento demostró que los LB contribuyen al desarrollo del lupus mediante vías independientes de la generación de auto-anticuerpos. Dicha vía lleva relación con su capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno (APCs) dado que poseen moléculas de tipo MHC-II en su superficie. De esta manera los LB son capaces de unir auto-antígenos a través del receptor de LB (BcR), procesarlos y presentarlos a LT (Tobón y col. 2013). Por último, se ha demostrado que los LB también participan en el proceso de autoinmunidad al secretar quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 e IFN- $\gamma$  (Pathak & Mohan 2011).

Experimentos en donde se depleta de LB a ratones con predisposición a desarrollar lupus muestran una disminución en la severidad de la enfermedad pero no su erradicación, indicando claramente que los LB no son los únicos que contribuyen al desarrollo del LES (Shlomchik y col. 1994). La importancia de la participación de LT en el autoinmunidad fue determinada en experimentos donde

la eliminación constitutiva de éstos en modelos con predisposición al lupus inhibían el desarrollo de la enfermedad (La Cava 2009). Se ha demostrado que los LT participarían en la patogénesis del lupus al proveer a los LB con la ayuda necesaria para montar una respuesta inflamatoria y la producción de auto-anticuerpos con alta afinidad (Crispín y col. 2010). Además los LT también son capaces de infiltrar los órganos blanco, causando inflamación y daño tisular (Moulton & Tsokos 2011). Finalmente se ha demostrado que LT provenientes de pacientes con lupus o modelos murinos de la enfermedad muestran claras alteraciones en su transducción de señales luego de ser activados mediante el complejo TcR/CD3. A nivel celular los LT de pacientes con lupus muestran una activación espontánea, son resistentes a la apoptosis, a la inducción de anergia y tienen características proliferativas y de supresión anormales (La Cava 2009).

Los linfocitos T reguladores (LTreg), caracterizados por la expresión del factor de transcripción Foxp3, son una subpoblación de LT CD4<sup>+</sup> que tienen un rol importante en la mantención de la tolerancia periférica dado que son capaces de suprimir la proliferación de LT efectores auto-reactivos (Bonelli y col. 2010) y también inhibir la actividad de LB auto-reactivos (Ikuni y col. 2009). Dada su función, se ha sugerido que deficiencias cuantitativas y/o cualitativas en las poblaciones de LTreg podrían ser las causantes de la pérdida de tolerancia e inducción de autoinmunidad. Esta hipótesis ha sido corroborada ya que en animales a los que se les depleta de LTreg, se les gatilla autoinmunidad (Okamoto y col. 2011). La relación entre LTreg y lupus ha sido controversial dado que existen estudios en sangre de pacientes con LES que muestran aumentos y otros disminuciones de los porcentajes de LTreg en comparación a individuos sanos (Bonelli y col. 2010). Estudios en modelos murinos de la enfermedad han arrojado



las mismas controversias y no sólo en cuanto a las proporciones de LTreg sino que también respecto a su funcionalidad como células supresoras (Okamoto y col. 2011). Sin embargo, la mejor evidencia del rol positivo que tendrían los LTreg a favor de la mantención de tolerancia proviene de experimentos donde la transferencia adoptiva de un alto número de LTreg a ratones de la cepa con predisposición al lupus, (NZWxNZB) F1, retrasó el comienzo de la enfermedad (Horwitz 2008).

#### **1.3.4. Células Dendríticas y LES**

Las células dendríticas (DCs) son un grupo heterogéneo de células derivadas de precursores de la médula ósea que conectan al sistema inmune innato con el adaptable (Seitz & Matsushima 2010). Las DCs se especializan en la captura, procesamiento y presentación de antígeno que culmina en la inducción de una respuesta adaptable específica (Rönnblom & Pascual 2008). En los tejidos periféricos, las DCs se encuentran en un estado inmaduro y son altamente eficaces en la captura de antígenos. En respuesta a señales de activación éstas maduran y se transforman en células presentadoras de antígeno (APC). Las DCs pueden ser activadas mediante múltiples agentes, entre los cuales se incluyen los microorganismos, virus, células endógenas en apoptosis o necrosis y por células del sistema inmune innato y adaptable (Rönnblom & Pascual 2008). Además de presentar péptidos en el contexto de moléculas MHC-I o MHC-II a LT, las DCs tienen la capacidad de presentar glicolípidos y glicopéptidos a LT y polipéptidos a LB (Rönnblom & Pascual 2008). Las DCs expresan en su superficie un grupo de



moléculas coestimuladoras que permiten la activación de LT vírgenes lo que da origen a las respuestas inmunes primarias. A su vez, las DCs producen y secretan una amplia gama de quimioquinas cuya función es atraer distintas poblaciones linfocitarias dependiendo de la respuesta inmune inducida. Mediante la secreción de combinaciones específicas de citoquinas, las DCs participan en la diferenciación o polarización de LT vírgenes hacia LT Th1, Th2, Th17, LTreg, etc (Rönnblom & Pascual 2008).

Las DCs son comúnmente conocidas como los centinelas del organismo, dado que se encuentran constantemente vigilando la presencia de patógenos como señales de peligro. Bajo este rol es que se les considera las principales presentadoras de antígeno dado que son las únicas capaces de migrar hacia los linfonodos y activar LT vírgenes. Sin embargo, las DCs también cumplen un rol importante en la mantención de la tolerancia hacia auto-antígenos a través de múltiples mecanismos que incluyen la delección o inducción de anergia en LT auto-reactivos y la generación de LTreg (Hardin 2005). Este rol dual en la regulación tanto de respuestas inmunes inflamatorias como tolerogénicas sugiere fuertemente un rol protagónico de las DCs en la generación y desarrollo de enfermedades autoinmunes. Entre sus posibles roles en el LES se incluyen; presentación de auto-antígenos como inmunógenos a LT, incapacidad de eliminar LT auto-reactivos, sobre-producción de citoquinas inflamatorias y una inadecuada inducción de LTreg (Hardin 2005). Adicionalmente, se ha demostrado que las DCs también modulan la función de los LB de manera directa. En este sentido se ha reportado que las DCs pueden capturar y retener antígenos no procesados y transferirlo a LB vírgenes para iniciar una respuesta humoral (Wykes y col. 1998). Asimismo, son capaces de inducir la diferenciación terminal de LB hacia células

plasmáticas independiente de LT a través de la producción de IFN- $\alpha$  e IL-6 (Poeck y col. 2004; Jego y col. 2003; Mathian y col. 2011) y también de manera contacto dependiente (Jorgensen y col. 2009).

Las DCs pueden ser subdivididas principalmente en dos subgrupos según su fenotipo y funciones específicas: las células dendríticas convencionales (cDC) y las células dendríticas plasmocitoides (pDC). Las cDC derivan de un linaje monocítico y residen principalmente en tejidos epiteliales como la piel y órganos mucosos donde realizan su labor de inmunovigilancia (Seitz & Matsushima 2010). En ratón y humano, las cDC se caracterizan por expresar elevados niveles de la integrina CD11c y por su potente capacidad de activar LT vírgenes tras su maduración (Merad y col. 2013). Por otro lado en ratón, las pDC se identifican por la menor expresión de CD11c y por co-expresar B220, un marcador de LB. Funcionalmente, estas últimas son las principales productoras de IFN- $\alpha$ , por lo que también se les conoce como células productoras de IFN (IPCs: *IFN Producing Cells*) (Hardin 2005).

La participación de las DCs durante el desarrollo del lupus ha sido controversial, en parte porque no existe una clara distinción entre los múltiples subsets de DCs (Merad y col. 2013). En un estudio se reportó que la eliminación constitutiva de DCs en ratones sin predisposición al lupus gatilla autoinmunidad en éstos, sin embargo otros dos grupos han reportado lo contrario (Birnberg y col. 2008; Ioannou y col. 2013). Estos resultados contradictorios sugieren fuertemente que las DCs cumplirían un rol tanto positivo como negativo durante la generación de una respuesta inmune. En cuanto a la participación específica de las principales sub-poblaciones de DCs en el lupus, se sabe por ejemplo que las cDC tienen la habilidad de procesar material proveniente de células apoptóticas y necróticas y

presentarlo a LT bajo un contexto inmunogénico (Hopp y col. 2014). Contrario a esto, las pDC son incapaces de capturar este material apoptótico a menos que éste venga acoplado a complejos inmunes, en cuyo caso las pDC los procesan, se activan y liberan altas cantidades de IFN- $\alpha$  (Fransen y col. 2010). Como ya se mencionó con anterioridad, elevados niveles de IFN- $\alpha$  se correlacionan directamente con la producción de anticuerpos anti-nucleares en pacientes con lupus, lo que sugiere una relación directa entre las pDC y el LES. Adicionalmente se ha descrito que las pDC son capaces de regular la activación de LB auto-reactivos de forma directa, mediante contacto célula-célula, e indirecta, mediante factores solubles (Ding y col. 2009).

Existen además otras evidencias del rol protagónico que cumplen las DCs en el desarrollo del LES. Varios estudios, tanto en modelos murinos del lupus como pacientes con LES, han descrito la presencia de un fenotipo hiperactivado tanto de cDC como pDC, mediante la evaluación de marcadores de coestimulación y maduración como CD86, CD80 y MHC-II (Dacheng Ding y col. 2006; Colonna y col. 2006; Decker y col. 2006; Carreño y col. 2009; Gleisner y col. 2013). La hiperactivación de las DCs durante el desarrollo del lupus explican en parte la hiperactividad de los LT en esta enfermedad (Zhu y col. 2005).

Se ha descrito que en modelos murinos de lupus existe una acumulación de DCs tanto en sangre periférica (Ishikawa y col. 2002; Gleisner y col. 2013) como en el bazo (Kalled y col. 2001; Jorgensen y col. 2009; Gleisner y col. 2013). Por otra parte la reducción de DCs en un modelo con predisposición al lupus mejoró notablemente las patologías renales en los ratones sugiriendo así que las DCs contribuyen directamente al daño renal en el LES (Iwata y col. 2009).

A pesar de la totalidad de resultados a favor de un rol protagónico de las DCs en el lupus, aun falta determinar de manera más específica las funciones patológicas no-redundantes de las DCs en un contexto de autoinmunidad.

### **1.3.5. Tolerancia Central, DCs y LES**

La reacción inmune contra antígenos propios se previene inicialmente dentro del timo mediante un proceso llamado tolerancia central (Kyewski & Klein 2006). A pesar de que estos mecanismos son eficientes, éstos no son capaces de eliminar la totalidad de linfocitos auto-reactivos debido a que no todos los auto-antígenos son presentados en el timo. Por esta razón, existen mecanismos de tolerancia periférica que se encargan de eliminar a aquellos LT auto-reactivos que escapan a la periferia (Hogquist y col. 2005).

Muchos de los LT que se encuentran en desarrollo en el timo presentan receptores TcR que son incapaces de unirse a moléculas MHC en la superficie de APCs (Hogquist y col. 2005). Estos linfocitos T son eliminados mediante mecanismos de selección positiva haciendo que el repertorio de LT sólo contenga aquellos linfocitos capaces de reconocer péptidos unidos a moléculas MHC (Hogquist y col. 2005). Durante la selección positiva también se enriquece de LT auto-reactivos, sin embargo aquellos que reconocen con alta afinidad las moléculas MHC son eliminados mediante mecanismos de selección negativa (Abbas y col. 2010). El paso clave dentro del mecanismo de tolerancia central ocurre durante la selección clonal. En dicho proceso los linfocitos inmaduros que tienen una alta afinidad hacia auto-antígenos son eliminados mediante la inducción de apoptosis (Sprent & Kishimoto 2001). También se han descrito otros

mecanismos involucrados, como la anergia o edición del receptor TcR, sin embargo éstos ocurrirían de manera menos frecuente que la delección clonal (Hogquist y col. 2005). Estos tres mecanismos se encargarían de eliminar o inhibir a aquellos linfocitos auto-reactivos por lo que son considerados mecanismos de selección negativa. Sin embargo, también se reconoce que no todos los linfocitos auto-reactivos son eliminados, sino que un porcentaje de éstos son seleccionados con la finalidad de formar LTreg los que a su vez se encargarían de regular aquellas respuestas autoinmunes (Proietto y col. 2009).

En el lupus la enfermedad se desarrolla debido a la presencia de LB auto-reactivos los cuales requieren de la ayuda de LT CD4<sup>+</sup> auto-reactivos para su activación. Dado que LT auto-reactivos con una alta afinidad para péptidos propios son normalmente eliminados en el timo, su presencia durante el lupus son indicativos de una falla de los mecanismos de tolerancia central.

Para que la tolerancia central se lleve a cabo debe existir una concentración suficiente de auto-antígenos de manera que éstos sean procesados y presentados en moléculas MHC a los timocitos en desarrollo (Hadeiba & Butcher 2013). El rol del epitelio tímico en la presentación de auto-antígenos en el timo ha sido ampliamente estudiada (Klein y col. 2009), sin embargo la participación de las DCs en este proceso no ha sido claramente determinada. Por una parte la eliminación de las DCs de la médula tímica inhibe la delección clonal de LT (McCaughy y col. 2008). De manera más específica, Von Andrian y col. demostraron que DCs cargadas con antígeno migran hacia el timo e inducen la delección de LT CD4<sup>+</sup> específicos contra dicho antígeno (Bonasio y col. 2006). Por otra parte distintos experimentos realizados con DCs de timo de ratón o de humano han demostrado que éstas son capaces de inducir la generación de LTreg

a partir de timocitos (Proietto, Dommelen, y col. 2008; Martín-Gayo y col. 2010). Por último y quizás lo más relevante de todo, es que se demostró que los corpúsculos de Hassall en el timo secretan linfopoyetina estromal tímica (TSLP) la cual instruye a las DCs tímicas a inducir la generación de LTreg Foxp3<sup>+</sup> (Watanabe y col. 2005; Hanabuchi y col. 2010).

Se ha determinado que la presentación de antígenos periféricos en el timo sería gracias a la migración de DCs hacia dicho órgano (Proietto y col. 2009; Hadeiba & Butcher 2013). Es así como se determinó que dos de las tres subpoblaciones de DCs del timo provienen de la periferia (Li y col. 2009). Las DCs migratorias consisten en pDC inmaduras y cDC que expresan la proteína reguladora de señales alfa (Sirp $\alpha$ ), mientras que las DCs de origen intratímico serían cDC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>Sirp $\alpha$ <sup>-</sup> (Li y col. 2009).

Las cDC de origen intratímico se localizan específicamente en la médula del timo. La expresión de CD8 $\alpha$  en la superficie de estas células les permite presentar antígenos en complejo con MHC-I a LT CD8<sup>+</sup> (Hadeiba & Butcher 2013). Por otro lado las cDC migratorias que provienen de la periferia se localizan principalmente en el espacio perivascular y corteza del timo y son altamente endocíticas demostrándose su capacidad de capturar y procesar antígenos provenientes de la sangre (Hadeiba & Butcher 2013). Además son capaces de inducir la delección clonal de LT antígeno específicos e inducir la generación de LTreg tímicos (Hadeiba & Butcher 2013).

Las pDC tímicas son una subpoblación de DCs que son reclutadas a partir de la sangre y que se localizan principalmente en la zona cortico-medular del timo. En su estado inactivado e inmaduro las pDC se caracterizan por tener una baja capacidad de presentación antigénica sugiriendo que su rol en el timo sería

protegerlo ante infecciones virales mediante la secreción de IFN- $\alpha$ . Sin embargo, se ha demostrado que las pDC intratímicas de humano, al igual que las cDC migratorias, son capaces de inducir tolerancia al participar en la generación de LTreg tímicos (Hanabuchi y col. 2010). Se ha determinado que los LTreg inducidos por cDC o pDC tímicas presentan fenotipos distintos. Los Treg tímicos inducidos por pDC son eficientes productores de IL-10 y tienen una baja capacidad de secretar TGF- $\beta$  en comparación con aquellos inducidos por cDC (Matta y col. 2010).

Por otro lado se ha determinado que las pDC tolerogénicas que migran al timo se caracterizan por la expresión en su superficie del receptor de quimioquinas CCR9 y que éstas son capaces de transportar antígenos periféricos hasta el timo para promover la tolerancia central (Hadeiba y col. 2012). Sin embargo la deficiencia de CCR9 no bloquea del todo la migración de pDC hacia el timo, sugiriendo la existencia de otros mecanismos de homing hacia este órgano (Hadeiba y col. 2012).

Es importante mencionar que el transporte de antígenos periféricos al timo requiere de un cuidadoso control con la finalidad de prevenir la inducción de tolerancia hacia moléculas patogénicas. Pareciera ser que dicho control se logra a través de la supresión de la migración de DCs que cargan motivos patogénicos a través de los receptores tipo toll (TLR) (Hadeiba & Butcher 2013). En el caso de las pDC se ha demostrado que la activación mediante TLR9, el cual capta ADN de microorganismos, disminuye la expresión de CCR9 en la superficie de las pDC, previniendo así el transporte de antígenos patogénicos al timo (Hadeiba y col. 2012).



#### **1.4. Modelo murino de lupus: BWF1**

Los modelos murinos más utilizados en el estudio del lupus son los ratones de la cepa MRL/lpr, BXSB/Yaay y los de la cepa (NZWxNZB) F1 (Perry y col. 2011). La cepa (NZWxNZB) F1, también llamada BWF1, son ratones provenientes de la cruce entre las cepas New Zealand Black (NZB) y New Zealand White (NZW).

Durante este trabajo se utilizó el modelo murino BWF1, el cual desarrolla espontáneamente, en un periodo relativo entre 6 a 10 meses de edad, una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de anticuerpos anti-nucleares (ANA) y por el desarrollo de una glomerulonefritis (GN) fatal mediada por complejos inmunes (Perry y col. 2011). Los anticuerpos antinucleares poseen múltiples especificidades contra diferentes antígenos entre los cuales se encuentran el ADN de hebra simple (ADNsh), el ADN de doble hebra (ADNdh) y complejos de proteínas con ácidos nucleicos (Gioud y col. 1983). En este modelo, las hembras son notablemente más susceptibles a desarrollar la enfermedad que los machos (Gubbels y col. 2014). Se considera que la cepa BWF1 es el modelo murino que mejor replica los síntomas observados durante la enfermedad del lupus en humanos lo que lo hace un excelente modelo para el estudio de varias de las anomalías inmunológicas características de esta enfermedad.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESIS**

En el modelo murino del lupus eritematoso sistémico, BWF1, las DCs presentan alteraciones fenotípicas que gatillan cambios en sus propiedades funcionales y migratorias lo cual incide en el desarrollo de la enfermedad.

### **2.2. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar las sub-poblaciones de células dendríticas plasmocitoides y convencionales en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico y evaluar su rol durante el desarrollo de la enfermedad.

### **2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.3.1** Caracterizar mediante marcadores de superficie específicos la subpoblación de células dendríticas plasmocitoides que se encuentra aumentada en el bazo de ratones lúpicos.

**2.3.2** Evaluar la migración de células dendríticas de ratones lúpicos y controles a distintos órganos linfoides.

**2.3.3** Evaluar la sobrevivencia de células dendríticas provenientes de ratones lúpicos y controles.

**2.3.4** Caracterizar mediante marcadores de superficie las sub-poblaciones de células dendríticas presentes en timo de ratones lúpicos, prelúpicos y controles.

**2.3.5** Evaluar *in vitro* el rol de células dendríticas de ratones lúpicos en la eliminación de LT inmaduros e inducción de LT reguladores en el timo.

**2.3.6** Determinar *in vivo* el rol de las DCs en el desarrollo del lupus mediante experimentos de transferencia adoptiva de DCs de ratones lúpicos para determinar si se acelera o se induce la enfermedad en ratones receptores prelúpicos.

**2.3.7** Determinar *in vitro* el rol de DCs de ratones lúpicos sobre la maduración de LB.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIALES**

##### **3.1.1. Animales**

Ratones hembras BWF1 y NZW se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Para los experimentos se utilizaron ratones BWF1 de 6-10 meses de edad que denominamos lúpicos ya que producen anticuerpos anti-ADNdh y presentan daño renal evidenciado por los altos niveles de proteína en la orina (proteinuria de 500mg/dL). Como control, se utilizaron ratones BWF1 de 3-4 meses de edad, que denominados prelúpicos dado que no poseen ningún síntoma de la enfermedad. La enfermedad en ratones lúpicos fue evaluada mediante análisis de proteinuria medida de forma semi-cuantitativa utilizando tiras reactivas Combur Test N (Roche Diagnostics, Alemania) en conjunto con un análisis de anticuerpos anti-ADNdh en el suero mediante un ensayo convencional de ELISA (Métodos 3.2.1 y 3.2.2). Como controles adicionales se utilizaron ratones hembras de la cepa no-autoinmune (NZWxBalb/c) F1, los cuales presentan el mismo haplotipo H-2 que los ratones BWF1. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad, con aire filtrado y comida autoclavada, 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.

### 3.1.2. Anticuerpos

Anticuerpos monoclonales específicos para ratón adquiridos en BioLegend (San Diego, CA): CD86 PE (clon GL1), CD138 PE (clon 281-2), CD45R/B220 PeCy7 (clon RA3-6B2), CD4 PE (clon RM4-5), CD19 FITC (clon 6D5), CD3 FITC (clon 17A2), IgM PeCY7 (clon RMM-1), PDCA-1 APC (clon 927), CD11c FITC (clon N418), IgG2b,k APC (clon RTK4530).

Anticuerpos monoclonales específicos para ratón adquiridos en eBioscience (San Diego, CA): CD5 PeCy7 (clon 53-7.3), CD11c PE (clon N418), IFN- $\gamma$  FITC (clon XMG1.2), CD62L PE (clon MEL-14), CD25 APC (clon PC61.5), CD8 APCH7 (clon 53-6.7), CD9 FITC (clon KMC8), CCR9 PE (clon CW1.2), CD19 APC-eFluor 780 (clon 1D3), CD274 PE (clon MIH5), CD273 PE (clon TY25), Foxp3 PE Cy7 (clon FJK-16s), Siglech APC (clon eBio440c), CD16/32 (clon 93), CD3 purificado (clon 145-2C11), IgG2a,k PE (clon eBM2a).

Anticuerpos monoclonales específicos para ratón adquiridos en BD Pharmingen (San Diego, CA): IgD FITC (clon 11-26c.2a), IAd FITC (clon AMS-32.1), IAd purificado (clon 34-5-3), CD79b FITC (clon HM79b), Armenian Hamster IgG2/3 FITC (clon G70-204).

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

Otros: anti-IgG de ratón conjugado a HRP hecho en cabra (DAKO, USA).

### 3.1.3. Equipos

- Citómetro de flujo FACSCanto II, BD Biosciences, California USA

- Emax Precision Microplate Reader, Molecular Devices, USA
- BD FACSAria III cell sorter, BD Biosciences, California USA
- Centrifuga 5804 R, Eppendorf
- Centrifuga 5402, Eppendorf
- Incubador de CO<sub>2</sub> Serie 8000 WJ, Thermo Scientific, USA
- Microscopio Óptico Labophot-2, Nikon, USA

#### **3.1.4. Programas**

- BD FACSDiva v.6.1.3, BD Biosciences, California USA
- FlowJo v7.6.5 32bit para Macintosh, Tree Star, Inc., Trustees of Leland Stanford, Oregon USA, <http://www.flowjo.com>
- BD CBA Software, BD Biosciences, California USA
- SOFTmaxPRO v.4.0, Life Sciences Edition, USA
- GraphPad Prism 5 para Mac OS X, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)

## **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 hrs a 4°C. Luego se obtuvo el suero y éste se centrifugó a 250 x g por 10 min a 4°C para eliminar restos de eritrocitos. Los sueros fueron guardados a -20°C hasta su posterior utilización para ensayos de ELISA y CBA.

### **3.2.2. ELISA para la detección de anticuerpos anti-ADN doble hebra**

Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nalgene Nunc International, USA) 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 horas a 37°C y se lavó una vez con PBS-Tween 0,05%. Luego, las placas se bloquearon durante 1 hora 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 hora a temperatura ambiente. Luego las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra y conjugado a HRP (DAKO, USA) diluido 1/2000 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, USA). La reacción se detuvo usando 50µl por pozo de una solución 1M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merk,USA) y se leyeron las densidades ópticas a 450 nm en un lector de placas (Molecular Devices, USA).

### **3.2.3. Aislamiento de células de médula ósea, linfonodos, bazo y timo.**

**Médula Ósea (MO):** Se disecaron tibias y fémures y los huesos se perfundieron con 10 ml de medio RPMI (Gibco, Life Technologies, USA). La médula ósea se disgregó mediante agitación fuerte para obtener una suspensión homogénea y las células obtenidas se pasaron a través de una gaza para eliminar los agregados celulares. Para la lisis de los glóbulos rojos se incubaron las células con 2 ml de una solución comercial RBC Lysis Buffer (BioLegend, USA) durante 5 minutos a 4°C. Luego las células fueron lavadas con 10 ml de PBS + 10% FBS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C.

**Linfonodos y timo:** Las células se obtuvieron a partir de linfonodos periféricos (PLN), linfonodos mesentéricos (MLN) y timo. Los órganos se disgregaron mecánicamente y se trataron con 1 mg/ml de colagenasa D (Roche, USA) y 20 U/ml de DNAsa-I (Roche, USA) en medio PBS + 2% FBS por 45 minutos a 37°C con agitación suave. Posteriormente, los tejidos se pasaron a través de una malla metálica de 90 µm para eliminar los agregados celulares.

**Bazo:** Los bazos fueron disgregados mecánicamente y tratados con 1 mg/ml de colagenasa D (Roche, USA) y 20 U/ml de DNAsa-I (Roche, USA) en medio PBS + 2% FBS por 45 minutos a 37°C con agitación suave.



Posteriormente, los tejidos se pasaron a través de una malla metálica de 90  $\mu\text{m}$  para eliminar los agregados celulares. Para la lisis de los glóbulos rojos se incubaron las células con 2 ml de una solución comercial RBC Lysis Buffer (BioLegend, USA) durante 5 minutos a 4°C. Luego las células fueron lavadas con 10 ml de PBS + 10% FBS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C.

Las células obtenidas de cada órgano se contaron mediante una cámara de Neubauer para obtener el número absoluto de células recolectadas. Las distintas poblaciones celulares fueron analizadas mediante la utilización de anticuerpos específicos y el uso de citometría de flujo.

#### **3.2.4. Purificación magnética de DCs de bazo**

Para los ensayos de apoptosis y migración competitiva se utilizaron DCs totales purificadas por columnas magnéticas. El bazo de los diferentes ratones fueron disgregados mecánicamente y digeridos enzimáticamente (Métodos 3.2.3). En seguida, las células fueron lavadas una vez con 10 ml de buffer de purificación (PBS, EDTA 2mM, FBS 0,5%), se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos y se resuspendieron en 300  $\mu\text{l}$  de buffer de purificación por cada  $1 \times 10^8$  de células y se incubaron con 30  $\mu\text{l}$  de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec) durante 20 minutos a 4°C con agitación. Enseguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de buffer de purificación, se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos y se resuspendieron en 1 ml de buffer de purificación. Las células se seleccionaron positivamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec). La pureza de DCs totales fue siempre mayor al 95%, evaluado mediante

citometría de flujo.

### **3.2.5. Purificación magnética de LB de bazo**

Para los co-cultivos de LB de bazo de ratones pre-lúpicos con DCs se purificaron LB mediante columnas magnéticas. El bazo se disgregó mecánicamente y se pasó a través de una malla metálica de 90  $\mu\text{m}$  para eliminar los agregados celulares. Para lisar los glóbulos rojos las células se incubaron con 2 ml de una solución comercial RBC Lysis Buffer (BioLegend, USA) durante 5 minutos a 4°C. En seguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de RPMI + 10%FBS y se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Luego se resuspendieron a una concentración de  $20 \times 10^6$  de células en 40  $\mu\text{L}$  de buffer de purificación (PBS, EDTA 2mM, FBS 0,5%) y se incubaron con 10  $\mu\text{l}$  de Antibody cocktail del B cell isolation kit (Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a 4°C con agitación suave. Transcurrido este tiempo, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de buffer de purificación por cada  $20 \times 10^6$  células y 20  $\mu\text{L}$  de Biotin beads del B cell isolation kit (Miltenyi biotec, USA). Las células se incubaron 15 minutos en oscuridad y agitación suave a 4°C. Las células se seleccionaron negativamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec, USA). La pureza de LB totales fue siempre mayor al 95%, evaluado mediante citometría de flujo.

### **3.2.6. Purificación de diferente sub-poblaciones celulares mediante *cell sorter*.**

Para purificar DCs totales del bazo de ratones controles y lúpicos se realizó la digestión enzimática de acuerdo al protocolo previamente descrito

(Métodos 3.2.3.). Dado que las DCs en el bazo representan un bajo porcentaje de las células totales (aproximadamente 1-2%) las suspensiones celulares fueron previamente depletadas de LT y LB. Para depletar de LB se incubó el extracto de células totales con el anticuerpo anti-CD79b FITC (clon HM79b; BD Pharmingen) durante 15 min a 4°C en agitación suave y oscuridad. Luego las células fueron lavadas y posteriormente incubadas durante 15 min a 4°C, en oscuridad y agitación con el anticuerpo secundario anti-Armenian Hamster IgG2/3 FITC (clon G70-204; BD Pharmingen). Luego las células fueron lavadas y resuspendidas a una concentración final de  $20 \times 10^6$  células/mL en medio PBS + 2mM EDTA + 0,1% BSA. Las células marcadas fueron incubadas con Dynabeads anti-IgG de ratón hecho en cabra (Invitrogen, Noruega) durante 30 min a 4°C en oscuridad y agitación. Pasado el tiempo de incubación las células fueron pasadas por magneto (DynaL MPC-1, Noruega) y la fracción negativa fue recuperada. Posteriormente la fracción negativa fue depletada de LT. Para esto las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD3 FITC (clon 17A2; BioLegend) durante 15 min a 4°C en agitación suave y oscuridad. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas a una concentración final de  $20 \times 10^6$  células/mL con medio PBS + 2mM EDTA + 0,1% BSA. Las células marcadas fueron incubadas con Dynabeads anti-IgG de rata hecho en oveja (Invitrogen, Noruega) durante 30 min a 4°C en oscuridad y agitación suave. Pasado el tiempo de incubación las células fueron pasadas por magneto (DynaL MPC-1, Noruega) y la fracción negativa fue recuperada. Finalmente las células fueron marcadas con los anticuerpos anti-CD79b FITC, anti-CD11c PE y anti-B220 PeCy7. Las células dendríticas fueron purificadas utilizando un *cell sorter* FACSAria II (BD Biosciences) según el fenotipo  $CD79b^-CD11c^+B220^{+/-}$  para

obtener tanto cDC (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>) como pDC (CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>). La pureza de DCs totales de bazo de ratones controles y lúpicos fue siempre mayor al 98%, evaluado mediante citometría de flujo.

Para la purificación de DCs totales a partir de timo de ratones controles y lúpicos se realizó la digestión enzimática del órgano de acuerdo al protocolo previamente descrito (Métodos 3.2.3.). Las suspensiones celulares se marcaron con anti-CD3 FITC, anti-CD11c PE y anti-CD19 APCeFluor780 y se purificaron las células CD11c<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup> utilizando un *cell sorter* FACS Aria II (BD Biosciences). La pureza de DCs totales de timo fue siempre mayor al 90%.

### **3.2.7. Citometría de flujo para marcadores de superficie en linfocitos provenientes de órganos linfoides.**

Las células de los distintos órganos (bazo, PLN, MLN, timo y MO) se incubaron por 15 minutos con Fc block (anti-CD16/CD32 dilución 1/400; clon 2.4G2, BD Biosciences) para bloquear FcR, posteriormente las células se lavaron con PBS + 2% FBS y se centrifugaron a 600 x g por 7 min. Luego las células se incubaron con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos diluidos en PBS + 2% FBS durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Enseguida las células se lavaron con PBS + 2% FBS, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 300 µL de PBS + 2% FBS para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, USA). Las células muertas fueron descartadas utilizando yoduro de propidio (1,5 ng/µL por cada 0,5x10<sup>6</sup> células; Sigma Aldrich, USA). Los análisis de los datos se realizaron utilizando los programas FACS Diva y FlowJo.

### **3.2.8. Citometría de flujo para marcadores de superficie en linfocitos sanguíneos.**

Se extrajo sangre a partir de la vena lateral de la cola de los ratones analizados. La sangre se recibió en heparina (Laboratorio Sanderson, Chile) en una relación 2:1 v/v. La unión inespecífica de anticuerpos se bloqueó incubando las células con Fc block (anti-CD16/CD32 dilución 1/400; clon 2.4G2, BD Biosciences) por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos diluidos en PBS + 2% FBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se agregó 1 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, USA) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y oscuridad. Enseguida las células se centrifugaron a 620 x g durante 5 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 200 µL de PBS + 2% FBS para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, USA). Los análisis de los datos se realizaron utilizando los programas FACS Diva y FlowJo.

### **3.2.9. Citometría de flujo para la detección intracelular de citoquinas y factores de transcripción.**

Para el marcaje intracelular del factor de transcripción Foxp3, luego del marcaje de superficie (Métodos 3.2.7.), las células se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en 300 µL de la solución de fijación/permeabilización (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-Foxp3 (eBioscience) o el control de isotipo (rat IgG2a k, eBioscience) diluidos en buffer de permeabilización (dilución óptima previamente determinada). Se incubó por 30 minutos en oscuridad a 4°C, 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 FVD eFluor780 (1 µL/mL) (eBioscience). Los análisis de los datos se realizaron utilizando los programas FACS Diva y FlowJo.

Para el marcaje intracelular de IFN-γ primero se activaron esplenocitos totales en RPMI + 10% FBS ( $1 \times 10^6$  células/mL) agregando acetato de forbol miristato (PMA) (0,25 µM, Sigma), ionomicina (1 µg/mL; Sigma) y brefeldina A (BFA) (10 µg/mL; BD Biosciences) durante 4 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Luego las células se recuperaron y fueron lavadas con RPMI + 10% FBS. Posterior al marcaje de superficie (Métodos 3.2.7.), las células se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL en 200 µl de la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C y oscuridad. Luego las células se lavaron con buffer Perm/Wash (BD Biosciences) y se centrifugaron a 720 x g por 8 minutos a 4°C. Se agregó a cada tubo el anticuerpo anti-IFN-γ diluido en buffer Perm/Wash y se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se lavaron las células con 700 µL del buffer Perm/Wash y se centrifugaron a 720 x g por 8 minutos. Finalmente se resuspendieron en PBS + 2% FBS para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, USA). Para descartar células muertas del análisis se utilizó el

reactivo FVD eFluor780 (1  $\mu$ L/mL) (eBioscience). Los análisis de los datos se realizaron utilizando los programas FACS Diva y FlowJo.

### **3.2.10. Ensayo de Apoptosis celular**

Se purificaron DCs a partir del bazo de ratones lúpicos y controles mediante selección positiva a través de partículas anti-CD11c MACS (Miltenyi Biotec) (Métodos 3.2.4.). Las DCs purificadas se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en medio RPMI + 10% FBS en presencia o ausencia de 50  $\mu$ M del alcaloide isoquinolínico Berberina (Sigma Aldrich, USA), el cual induce apoptosis en DCs (Hu y col. 2011), durante 5 hrs. Luego las células fueron lavadas con PBS + 2% FBS y centrifugadas a 600 x g por 7 min. Para el análisis de apoptosis entre distintas sub-poblaciones de DCs, las células fueron inicialmente marcadas con una combinación específica de anticuerpos (Métodos 3.2.7) y lavadas nuevamente. Finalmente las células fueron incubadas con 1  $\mu$ L de Annexin V-FITC (BD Pharmingen) y 2  $\mu$ L de Yoduro de Propidio (PI) (50  $\mu$ g/mL) por cada 1 x 10<sup>6</sup> células en una solución de Binding Buffer (CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Hepes 0,01 M, NaCl 0,14 M) durante 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200  $\mu$ L de Binding Buffer por muestra para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, USA). El marcaje Annexin V/PI permite distinguir cuatro poblaciones según la viabilidad celular: células vivas (Annexin V-/PI-), células en apoptosis temprana (Annexin V+/PI-), células en apoptosis tardía o necrosis (Annexin V+/PI+) y células muertas o debrís celular (Annexin V-/PI+).

### 3.2.11. Ensayos de Migración Competitiva

Células dendríticas purificadas del bazo de ratones control (Métodos 3.2.4.) se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml en medio DMEM suplementado con FBS 2% y 20 mM HEPES. Las células se incubaron con 2  $\mu$ L Calceína 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L por cada  $1 \times 10^7$  células/mL con agitación a 37°C por 20 minutos y en oscuridad. Posteriormente se agregó gota a gota a la suspensión celular un volumen igual de FBS. Las células se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 20°C utilizando una razón de aceleración y desaceleración igual a 4 con el fin de formar un gradiente. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de medio DMEM suplementado que se encontraba a temperatura ambiente. Las células se dejaron reposar por 5 minutos antes de ser utilizadas.

Células dendríticas purificadas del bazo de ratones lúpicos (Métodos 3.2.4.) se resuspendieron a una concentración de  $15 \times 10^6$  células/ml en medio DMEM suplementado con FBS 2% y 20 mM HEPES. Las células se incubaron con 20  $\mu$ L TRITC 90  $\mu$ g/mL por cada  $15 \times 10^6$  células/ml en agitación a 37°C por 20 minutos y en oscuridad. Posteriormente se agregó gota a gota a la suspensión celular un volumen igual de FBS. Las células se centrifugaron a 400 x g por 10 minutos a 20°C utilizando una razón de aceleración y desaceleración igual a 4 con el fin de formar un gradiente. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de medio DMEM suplementado que se encontraba a temperatura ambiente. Las células se dejaron reposar por 5 minutos antes de ser utilizadas.



Para realizar los ensayos de migración competitiva se mezclaron  $4 \times 10^6$  DCs provenientes del bazo de ratones control marcadas con Calceína con  $4 \times 10^6$  de DCs provenientes del bazo de ratones lúpicos marcadas con TRITC. Las células se centrifugaron a  $450 \times g$  por 7 minutos y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de medio DMEM suplementado con FBS 2% y 20 mM Hepes. Mediante citometría de flujo se evaluó los porcentajes de células Calceína positivos y TRITC positivos iniciales, denominado input, para considerarlo en la ecuación utilizada para calcular el índice de homing. La suspensión celular final se inyectó vía intravenosa en ratones controles o lúpicos. Después de 24 hrs los ratones se sacrificaron y se extrajo el bazo, MO, MLN y PLN. Se realizó la digestión de los órganos de acuerdo al protocolo previamente descrito (Métodos 3.2.3.). El índice de homing (IH) se determinó mediante citometría de flujo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$I. H. = \frac{(DCs TRITC^+)_{\text{órgano}} / (DCs Calceína^+)_{\text{órgano}}}{(DCs TRITC^+)_{\text{input}} / (DCs Calceína^+)_{\text{input}}}$$

Donde,

$(DCs TRITC^+)_{\text{órgano}}$ : número de eventos TRITC<sup>+</sup> en bazo, MO, MLN o PLN.

$(DCs Calceína^+)_{\text{órgano}}$ : número de eventos Calceína<sup>+</sup> en bazo, MO, MLN o PLN.

$(DCs TRITC^+)_{\text{input}}$ : número de eventos TRITC<sup>+</sup> del input.

$(DCs Calceína^+)_{\text{input}}$ : número de eventos Calceína<sup>+</sup> del input.

### 3.2.12. Co-cultivo de sub-poblaciones de DCs de timo con timocitos

Se extrajeron timos de ratones lúpicos y controles y se obtuvo suspensiones celulares homogéneas de éstos órganos (Métodos 3.2.3.).

Mediante cell sorter (Métodos 3.2.6.) se purificaron las DCs tímicas totales.

Los timocitos utilizados en los co-cultivos fueron depletados de células presentadoras (APC). Para esto, se extrajo timo de ratones controles (NZWxBalb/c) F1 pareados por sexo y edad respecto a los ratones lúpicos utilizados. Los timos se disgregaron mecánicamente y se pasaron a través de una malla metálica de 90  $\mu\text{m}$ , luego las células se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos. Posteriormente se incubaron las células a  $100 \times 10^6$  células/ml por 10 minutos en RPMI + 10% FBS y se agregó Fc block (anti-CD16/CD32 dilución 1/400) (clon 2.4G2, BD Biosciences). Luego se agregó 1  $\mu\text{L}$  del anticuerpo puro anti-IAd por cada  $1 \times 10^7$  células y se incubó durante 15 minutos a 4°C en agitación suave. Luego las células fueron lavadas con buffer de purificación (PBS, EDTA 2mM, FBS 0,5%) a 600 x g por 7 minutos. Posteriormente se resuspendieron las células en 80  $\mu\text{L}$  de buffer de purificación por cada  $1 \times 10^7$  células y se incubaron con 20  $\mu\text{L}$  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 600g x 7 minutos y las células se seleccionaron negativamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec).

Para llevar a cabo el co-cultivo, las DCs de timo y los timocitos fueron esterilizados utilizando medio RPMI + 10% FBS suplementado con antibióticos (300 U/ml penicilina + 0,3mg/ml estreptomicina). Finalmente se realizaron los co-cultivos utilizando placas de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc Thermo Scientific, Dinamarca) y medio IMDM suplementado con 10% FBS, 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fungizona y 0,05  $\mu\text{M}$  B-mercaptoetanol. Se colocaron 20,000 DCs de timo con

100,000 timocitos depletados de APC (1 DC:5 LT) por pozo en presencia de 1 µg/ml de anticuerpo purificado α-CD3 (clon 145-2C11; eBiosciences). El cocultivo se mantuvo durante 5 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posterior a esto las células se recuperaron y se analizaron las poblaciones de LT y LT reguladores mediante citometría de flujo (Métodos 3.2.9).

### **3.2.13. Detección de citoquinas en sobrenadantes y suero**

La concentración de citoquinas en los sueros de los ratones de los experimentos de transferencia adoptiva y en los sobrenadantes de los cocultivos de timocitos con DCs se determinaron mediante el ensayo Cytometric Bead Array (CBA) según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, USA). Específicamente se utilizó el kit Th1/Th2/Th17 de ratón (Cytokine Kit BD Biosciences), el cual mide simultáneamente las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10 y el kit Inflamatorio de ratón (Cytokine Kit BD Biosciences), el cual mide simultáneamente las citoquinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN-γ, TNF, IL-12p70. El ensayo CBA permite medir las concentraciones de las anteriores citoquinas por citometría de flujo.

### **3.2.14. Transferencia adoptiva de DCs de bazo de ratones control o lúpico a ratones preláupicos.**

Se purificaron DCs totales de ratones controles o lúpicos mediante cell sorter de acuerdo al protocolo previamente descrito (Métodos 3.2.6.). 4,5 x 10<sup>6</sup> DCs de bazo de ratones control o lúpicos fueron resuspendidas en PBS e inyectadas intravenosamente (i.v.) a ratones preláupicos de 2 meses de edad

que no presentaban síntomas de la enfermedad. Se realizaron dos inyecciones i.v. de DCs por ratón, una al día denominado 0 y la segunda al día 20 post primera inyección. Durante el transcurso de 60 días se realizaron mediciones de proteinuria, anticuerpos anti-ADNdh en suero y fenotipo de LT/LB/DCs en sangre. Al día 60 post primera inyección los animales fueron sacrificados y se extrajo bazo y timo para analizar fenotipo de LT, LB y DCs mediante citometría de flujo (Figura 1).

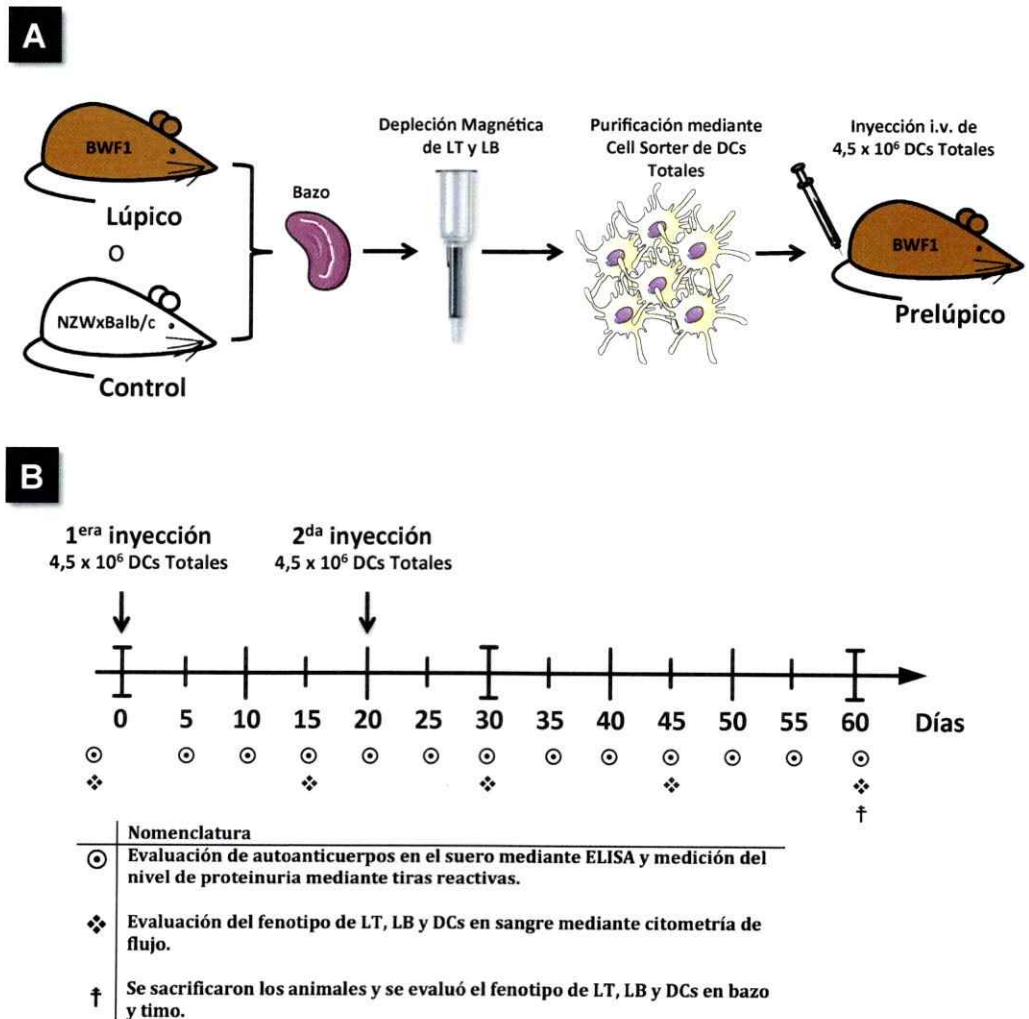


Figura 1. Metodología experimental de la transferencia adoptiva de DCs de bazo de ratones controles o lúpicos en ratones prelúpicos. A) DCs del bazo de ratones

controles y lúpicos fueron aisladas mediante cell sorter e inyectadas intravenosamente en ratones prelúpicos. B) Análisis realizados durante el transcurso de 60 días en los ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones control o lúpicos.

### **3.2.15. Co-cultivo de LB de bazo de ratones prelúpicos con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos.**

Se extrajeron bazos de ratones prelúpicos y se purificaron LB de acuerdo al protocolo previamente descrito (Métodos 3.2.5.). Mediante cell sorter (Métodos 3.2.6.) se purificaron DCs totales de bazo de ratones controles y lúpicos.

Para llevar a cabo el co-cultivo, las DCs y los LB fueron esterilizados utilizando medio RPMI+10%FBS suplementado con antibióticos (300 U/ml penicilina + 0,3mg/ml estreptomycin). Finalmente se realizaron los co-cultivos utilizando placas de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc Thermo Scientific, Dinamarca) y medio RPMI suplementado con 10% FBS y 0,05  $\mu$ M B-mercaptoetanol. Se colocaron 20,000 DCs de bazo de ratones controles o lúpicos con 100,000 LB de bazo de ratones prelúpicos (1 DC:5 LB) por pozo. El co-cultivo se mantuvo durante 24 hrs o 3 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posterior a esto las células se recuperaron y se analizaron las sub-poblaciones de LB y su estado de activación mediante citometría de flujo (Métodos 3.2.7.).

### **3.2.16. Análisis Estadístico**

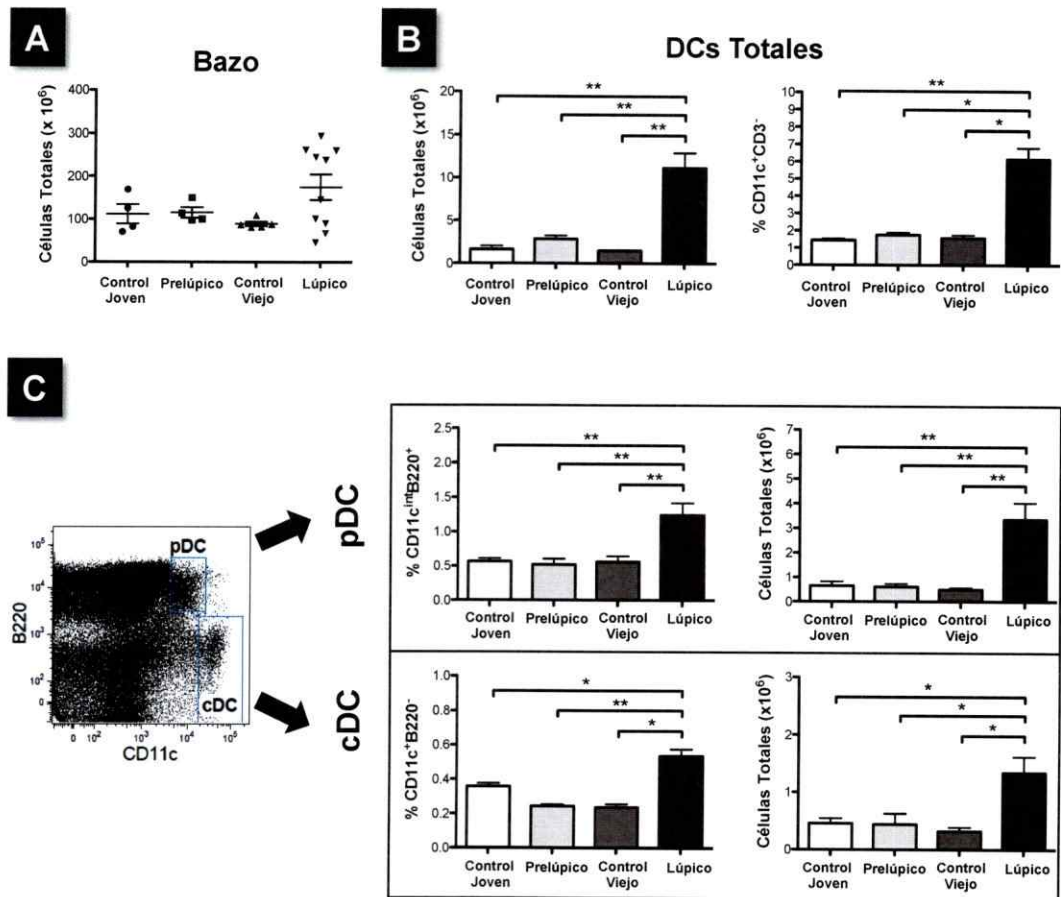
Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Graph Pad Prism program v5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos entre

ratones controles, prelúpicos y lúpicos fueron comparados utilizando un ANOVA de 1 vía con post test de Bonferroni tras la verificación de que los datos siguieran una distribución normal. De no haber una distribución normal de los datos se utilizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunns. Para la comparación entre dos grupos de datos se utilizó el test 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.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DCs del bazo de ratones lúpicos presentan alteraciones fenotípicas y homeostáticas.

Las DCs son las principales células presentadoras de antígeno del sistema inmune, y como tal son centrales para la iniciación de una respuesta inmune adaptable. Resultados previos del laboratorio demostraron la existencia de una expansión anormal de DCs en el bazo de ratones lúpicos (Jorgensen y col. 2009). Estos resultados fueron replicados en el presente estudio (Figura 2B). Cabe mencionar que algunos de los ratones lúpicos analizados presentaron esplenomegalia, fenómeno ya descrito para esta patología autoinmune (Perry y col. 2011), sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas en la celularidad total de los bazos entre ratones controles y lúpicos (Figura 2A). Estudios previos demostraron que tanto las cDC como las pDC se encontraban en mayor porcentaje y número en el bazo de ratones lúpicos (Gleisner y col. 2013), resultados que fueron replicados en el presente trabajo (Figura 2C). Dentro de las principales sub-poblaciones de DCs, las pDC han sido implicadas en el desarrollo del lupus dada su capacidad de secretar IFN- $\alpha$ . En el modelo murino estudiado, las pDC identificadas como CD11c<sup>int</sup> B220<sup>+</sup>, mostraron el mayor aumento tanto en porcentaje como en número absoluto (Figura 2C). Engleman y col. determinaron que las DCs productoras de IFN- $\alpha$  corresponden a una subpoblación de pDC caracterizada por la expresión del marcador de superficie CD9 y ausencia de la expresión de CCR9, PDCA-1 y SiglecH (Björck y col. 2011). En base a este resultado evaluamos estos marcadores en las pDC (CD11c<sup>int</sup> B220<sup>+</sup>) del bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. La Figura 3A muestra un ejemplo

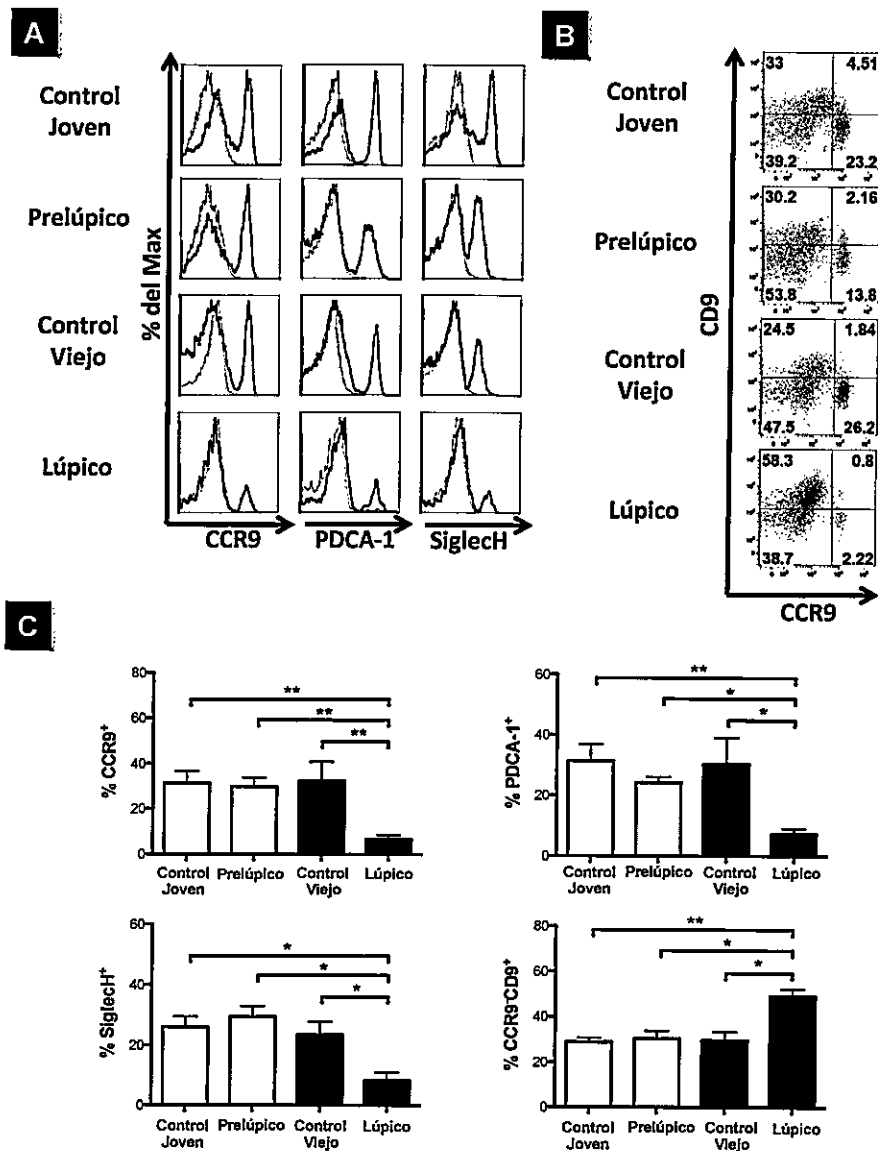


**Figura 2.** El bazo de ratones lúpicos presenta un aumento en el porcentaje y número absoluto de DCs en comparación a ratones prelúpicos y controles. **A)** Cuantificación del número total de esplenocitos obtenidos luego de la disgregación del bazo y posterior tratamiento con colagenasa y DNAsa. **B)** Los porcentajes de DCs se determinaron mediante citometría de flujo a partir de células CD3<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>. Los números absolutos de DCs se calcularon en base a los porcentajes obtenidos y el número total de células por bazo (A). **C)** Análisis representativo de citometría de flujo que ilustra la distinción entre los dos subsets principales de DCs correspondientes a las cDC (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>) y pDC (CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>). Los números absolutos de ambos subsets de DCs se calcularon en base a los porcentajes obtenidos y el número total de células por bazo. Las barras representan el promedio ± error estándar de los porcentajes de células positivas y números absolutos de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn's. \*p<0.05, \*\*p<0.001.



representativo de los histogramas para cada uno de los marcadores analizados en pDC de los distintos ratones donde se muestra que las pDC se dividen en dos subpoblaciones en base a la expresión de CCR9, PDCA-1 y SiglecH. La cuantificación de la subpoblación positiva para estos marcadores (Figura 3C) muestra que el porcentaje de estas células disminuye significativamente en las pDC de bazo de los ratones lúpicos. Por otra parte, el análisis de la expresión de CD9 muestra que la subpoblación de pDC que expresa este marcador es negativa para CCR9 (Figura 3B) y que el porcentaje de células CD9 positivas aumenta significativamente en las pDC de bazo de los ratones lúpico (Figura 3C).

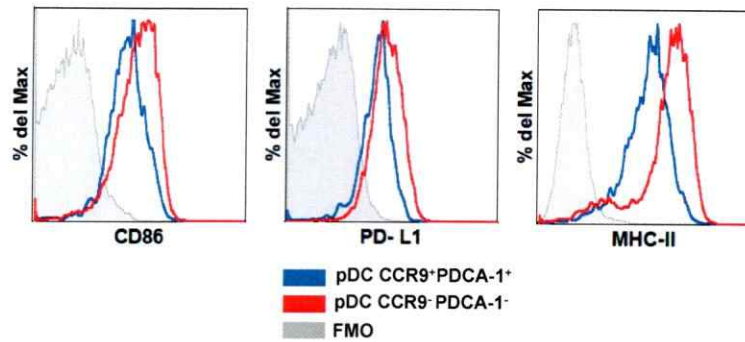
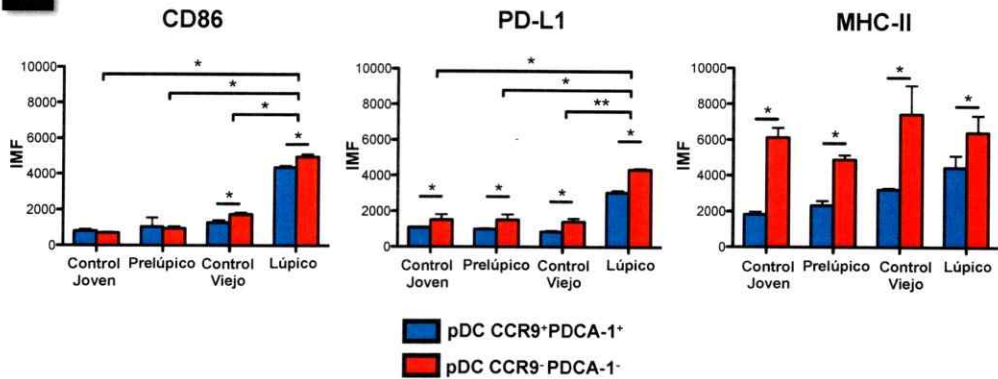
Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que tanto cDC como pDC del bazo de ratones lúpicos se encuentran en un estado de hiperactivación, fenotipo evidenciado por la alta expresión de los marcadores de activación y maduración CD86, CD80, PD-L1 y PD-L2 (Gleisner y col. 2013). Para estudiar este fenómeno en profundidad, separamos el análisis de las pDC en las subpoblaciones CCR9<sup>-</sup>PDCA-1<sup>-</sup> y pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>. Para evaluar el estado de activación de las pDC analizamos la expresión de las moléculas de co-estimulación CD86, PD-L1 y la molécula presentadora de antígeno MHC-II. La Figura 4A muestra un ejemplo representativo de la superposición de histogramas para cada uno de los marcadores de activación evaluados en pDC CCR9<sup>-</sup>PDCA-1<sup>-</sup> y pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup> del bazo de un ratón lúpico y en la Figura 4B se muestra el análisis estadístico de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de al menos 4 experimentos independientes. En esta figura observamos que en general la subpoblación de pDC CCR9<sup>-</sup>PDCA-1<sup>-</sup> (rojo) tanto en el bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos tienen una mayor expresión de CD86, PD-L1 y MHC-II en



**Figura 3.** Las pDC de bazo de ratones lúpicos poseen un fenotipo característico de células productoras de IFN- $\alpha$  (CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>SiglecH<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup>). **A**) Histogramas de fluorescencia para los marcadores CCR9, PDCA-1, SiglecH (línea negra) en una ventana CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup> (pDC) (control de isotipo histograma gris). Se ilustra un experimento representativo de al menos 4 experimentos independientes. **B**) Análisis representativo de citometría de flujo para los marcadores CD9 y CCR9 en una ventana CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>. **C**) Cuantificación de los resultados mostrados en A y B. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células positivas de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn's. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

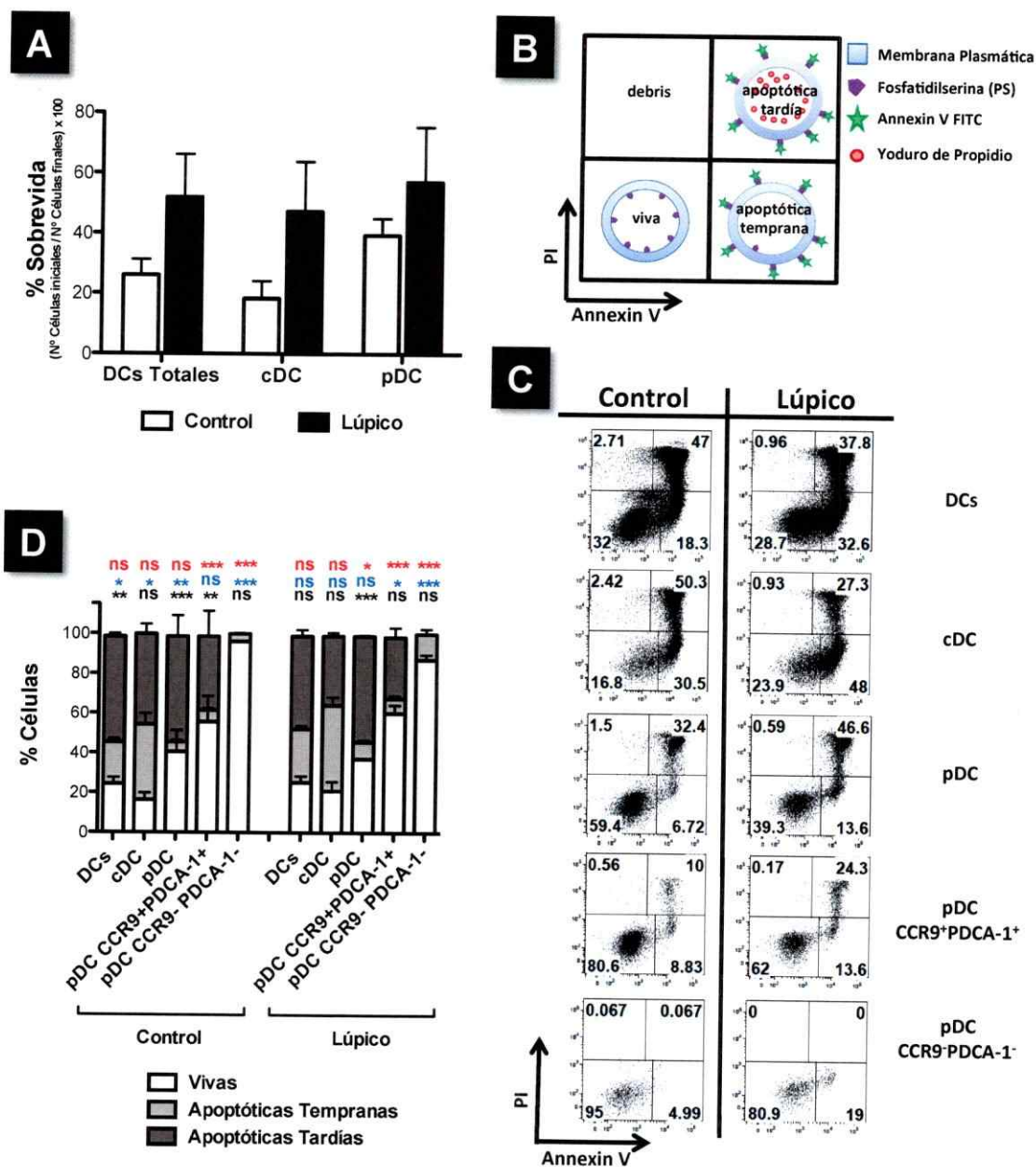
comparación a las pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup> (azul). Al observar los histogramas para MHC-II podemos distinguir dos sub-poblaciones donde la mayoría de las células que tiene una alta expresión de MHC-II corresponden a pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup>. Esto no es particular de los ratones lúpicos ya que el análisis en los ratones controles y prelúpicos se obtiene el mismo resultado, es decir, las pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup> se encuentran en un estado de mayor activación, como lo muestran además los resultados para CD86 y PD-L1.

La homeostasis en el sistema inmune consiste en la mantención de un numero constante y un repertorio heterogéneo de linfocitos a pesar del surgimiento de nuevos linfocitos y de la gran expansión de clones que ocurre durante una respuesta inmune. La homeostasis inmune se logra mediante la regulación de varias vías que involucran la muerte de linfocitos y/o su inactivación (Abbas y col. 2010). La acumulación anormal e incontrolada de DCs en el bazo de ratones lúpicos demuestra claramente la pérdida de homeostasis durante el desarrollo del lupus. La apoptosis es un proceso fisiológico normal involucrado en la mantención de la homeostasis tisular. Una posible explicación para la acumulación anormal de DCs en los ratones lúpicos es que las DCs adquieran la capacidad de sobrevivir en el microambiente linfoide durante el desarrollo del lupus. Para evaluar esta hipótesis se realizaron ensayos de inducción de apoptosis en DCs purificadas del bazo de ratones controles y lúpicos. Como inductor de la apoptosis se utilizó el alcaloide isoquinolínico berberina que induce apoptosis selectivamente en DCs (Hu y col. 2011). En primer lugar determinamos el porcentaje de sobrevivencia de las DCs de ratones controles y lúpicos expuestos a un tratamiento de 5 hrs con berberina. Para esto se contaron las células antes y después del tratamiento. En la

**A****B**

**Figura 4. Las pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup> presentan un mayor estado de activación comparado a pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>.** A) Superposición de histogramas de fluorescencia para los marcadores CD86, PD-L1 y MHC-II en una ventana CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup> o CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>. Experimento representativo de al menos 4 experimentos independientes. B) Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de 2 vías con post test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ . FMO: *fluorescence minus one* (control de fluorescencia en citometría multiparamétrica)

Figura 5A se muestra el porcentaje de sobrevivencia para DCs totales, cDC y pDC calculado a partir de los números absolutos de estas sub-poblaciones obtenidos por citometría de flujo. Se observa que existe una tendencia de las DCs, cDC y



**Figura 5.** Las pDC CCR9<sup>-</sup>PDCA-1<sup>-</sup> muestran una mayor resistencia a la apoptosis en comparación a pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup> y cDC. **A)** Análisis de la viabilidad celular como la razón entre las células totales iniciales y las células totales posterior al tratamiento de 5 hrs con 50  $\mu$ M del compuesto Berberina. **B)** Diagrama ilustrativo que permite identificar los distintos estadios de viabilidad celular luego del marcaje Annexin V y PI. **C)** Análisis de la apoptosis en DCs. El análisis por citometría de flujo fue sobre una ventana donde se descartó el debris celular pero no las células muertas. Luego las distintas sub-poblaciones de DCs fueron analizadas según su marcaje para Annexin V vs Yoduro de Propidio (PI).

Los números en los gráficos de puntos representan los porcentajes de células para cada cuadrante; Annexin V-/PI- (células vivas), Annexin V+/PI- (células en apoptosis temprana), Annexin V+/PI+ (células en apoptosis tardía), Annexin V-/PI+ (células muertas) . Se ilustra un resultado representativo de 3 experimentos independientes. C) Cuantificación de los resultados mostrados en B. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células vivas, apoptóticas y apoptóticas tardías. Asteriscos rojos indican diferencia significativa entre porcentaje de células vivas y células en apoptosis temprana. Asteriscos azules indican diferencia significativa entre porcentaje de células vivas y células en apoptosis tardía. Asteriscos negros indican diferencia significativa entre porcentaje de en apoptosis temprana y células en apoptosis tardía. El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de 2 vías con post test de Bonferroni. ns: no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

pDC de bazo de ratones lúpicos a tener una mayor sobrevivencia que las DCs de los ratones controles, sin embargo no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. La Figura 5B muestra en un diagrama de cómo se identificaron las células en las distintas etapas de viabilidad celular luego del marcaje Annexin V vs PI. La Figura 5C muestra un experimento representativo del ensayo de apoptosis en las células tratadas con Berberina. El análisis de apoptosis se realizó en cada una de las sub-poblaciones de DCs mediante citometría de flujo. La Figura 5D muestra el análisis estadístico de los porcentajes de células vivas, apoptóticas tempranas y apoptóticas tardías en las distintas sub-poblaciones de DCs de ratones controles y lúpicos de 3 experimentos independientes. Observamos que en general todas las sub-poblaciones de DCs de los ratones lúpicos tienen una resistencia a la apoptosis similar a las DCs de los ratones controles. Por otra parte observamos que las pDC poseen mayor resistencia a la apoptosis que las cDC. Luego, dentro de las pDC observamos que las pDC CCR9<sup>-</sup>PDCA-1<sup>-</sup> poseen una mayor resistencia a la apoptosis que las pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>. En conjunto estos

resultados demuestran que las pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup> son células resistentes a la apoptosis naturalmente, ya sea que provengan de ratones controles o lúpicos. Dicho resultado sugiere que la acumulación de pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>-</sup> en el bazo de ratones lúpicos podría deberse en parte a su mayor sobrevivencia intrínseca.

Otra hipótesis que exploramos en este trabajo involucra la capacidad migratoria de las DCs que les permitiría migrar diferencialmente hacia los órganos linfoides. Para probar esta hipótesis se purificaron DCs totales del bazo de ratones controles y lúpicos, se marcaron con moléculas fluorescentes y se inyectaron en ratones receptores controles o lúpicos con el objetivo de realizar un ensayo de migración o homing competitiva/o. Gleisner y col. realizaron experimentos similares a 48 horas donde observaron que las DCs de ratones lúpicos migran en mayor proporción al bazo comparado a DCs provenientes de ratones controles, independiente del ratón receptor utilizado, aunque el índice de homing fue 6 veces mayor cuando el ratón receptor era un ratón lúpico en vez de uno control, sugiriendo un rol del microambiente del bazo de ratones lúpicos para atraer o retener a las DCs (Gleisner y col. 2013). Sin embargo, dicho ensayo fue realizado a 48 horas por lo que no permite separar los fenómenos de migración preferencial al de sobrevivencia y acumulación. Por lo tanto en este trabajo se repitieron los experimentos anteriormente mencionados pero realizando el análisis 24 horas post transferencia. Asimismo se evaluó la capacidad migratoria de las DCs hacia distintos órganos además del bazo. La Figura 6A muestra el análisis de citometría de flujo de un experimento representativo donde las DCs del bazo de ratones lúpicos y controles fueron marcadas con TRITC y calceína respectivamente y mezcladas en una proporción 1:1, denominado input. La proporción de DCs convencionales vs plasmocitoides se ilustra en el gráfico a la derecha de la Figura

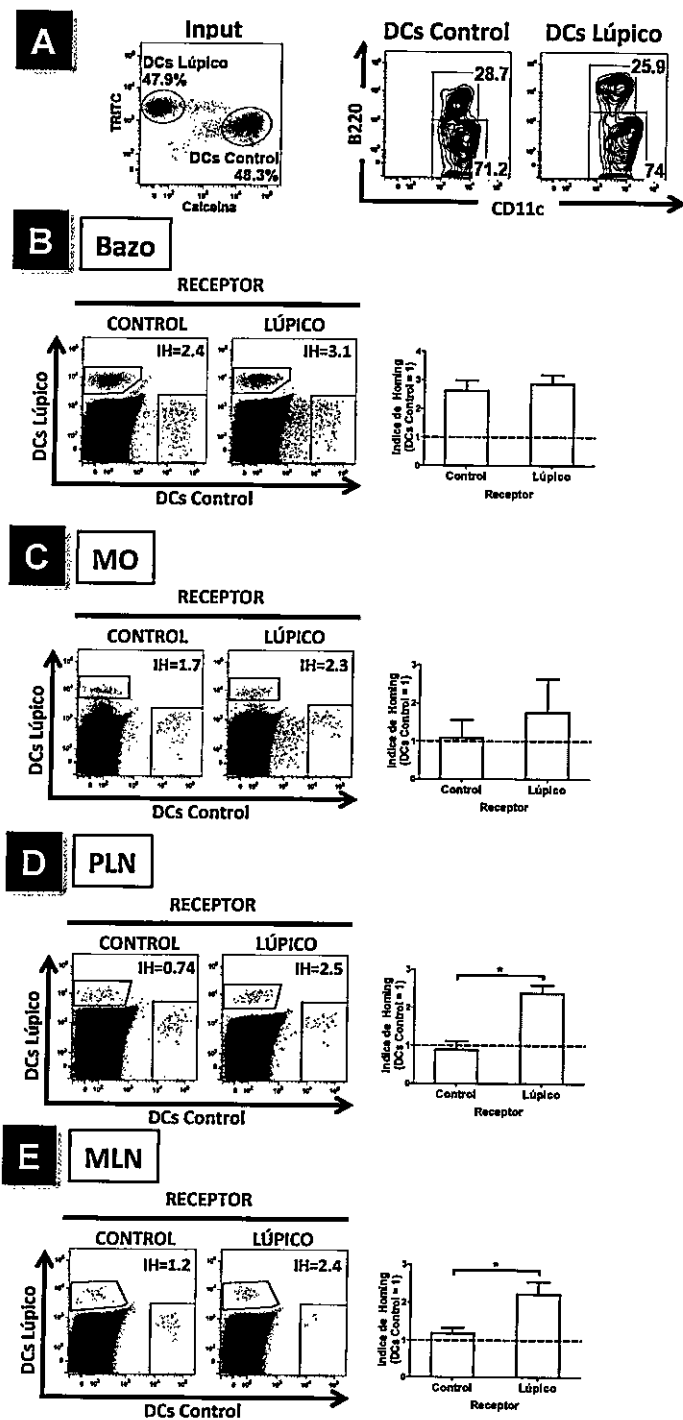


Figura 6. Las DCs del bazo de ratones lúpicos tienen una mayor capacidad migratoria en comparación a DCs de bazo de ratones controles. A) Gráficos de citometría de flujo de un experimento representativo donde se ilustra el marcaje de DCs purificadas a partir de bazo de ratones controles marcadas con calceína y DCs de bazo de



ratones lúpicos marcadas con TRITC. En los gráficos de la derecha se muestra un experimento representativo de las proporciones de cDC (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>) y pDC (CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>) que existen dentro de las DCs totales de cada tipo de ratón. El número al interior de cada gráfico representa el porcentaje de células positivas de cada ventana. B-E) Resultados de ensayos de migración competitiva obtenidos para Bazo, Médula Ósea (MO), Ganglios Periféricos (PLN) y Ganglio Mesentérico (MLN) respectivamente. A la izquierda, gráficos de citometría de flujo de un experimento representativo de un receptor control y otro lúpico los cuales fueron inyectados con igual número de DCs control marcadas con calceína y DCs de un ratón lúpico marcadas con TRITC. El número al interior de cada gráfico representa el Índice de Homing (IH) a las 24 hrs después de la transferencia adoptiva. A la derecha, los gráficos de barra muestran la media del IH para cada condición  $\pm$  error estándar de 4 experimentos independientes (test no paramétrico de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ ).

6A. Observamos que existe un mayor porcentaje de cDC en comparación a pDC tanto para ratones controles o lúpicos. Esto se debe a que la purificación magnética de DCs utiliza el anticuerpo anti-CD11c y dado que las cDC expresan de mayor manera esta integrina se obtiene un mayor porcentaje de éstas respecto a las pDC. Los gráficos de citometría de flujo ilustrados en las figuras 6 B a la E muestran un experimento representativo de 4 experimentos independientes donde se evaluó la migración de las DCs hacia el bazo, médula ósea (MO), ganglios periféricos (PLN) y ganglio mesentérico (MLN) respectivamente. A la derecha se muestra el análisis estadístico de los 4 experimentos independientes. Se determinó el índice de homing (IH) a las 24 horas. El IH se normaliza al control por lo que nos indica cuantas veces migran las DCs de ratones lúpicos respecto a las DCs de ratones controles. Al co-inyectar DCs de ratones controles y ratones lúpicos, se observó que en general las DCs que provienen de ratones lúpicos migran en mayor proporción a todos los órganos analizados en comparación a las DCs de ratones control, independiente del ratón receptor utilizado, evidenciado por

los índices de homing mayores a 1. Sin embargo se observaron mayores índices de homing cuando el receptor utilizado fue un ratón lúpico, aumento que fue estadísticamente significativo en el caso de PLN y MLN. En el caso de los órganos PLN, MLN y MO observamos que las DCs de ratones lúpicos sólo migran preferencialmente a estos órganos cuando se encuentran en un microambiente de autoinmunidad, es decir inyectadas en ratones receptores lúpicos. Esto sugiere un fuerte rol del microambiente autoinmune que gatilla el reclutamiento o retención de las DCs. Sin embargo en el caso del bazo las DCs de los ratones lúpicos migran más que las DCs de ratones controles independiente del ratón receptor utilizado lo que indica un componente intrínseco a las DCs que les permite aumentar su capacidad migratoria hacia este órgano. Estos resultados sugieren fuertemente que las DCs de bazo de ratones lúpicos poseen receptores de homing a bazo que se encuentran en menor proporción en las DCs de ratones que no desarrollan lupus. En conjunto estos experimentos sugieren que las DCs de ratones lúpicos poseen características funcionales que les otorgan una mayor capacidad migratoria y a la vez el microambiente de autoinmunidad, por ejemplo, aumento de citoquinas inflamatorias y mayor expresión de receptores de homing en los órganos linfoides, exacerbaría esta capacidad.

En resumen, determinamos que la población de pDC que se encuentra expandida en el bazo de ratones lúpicos corresponden a una subpoblación identificada como  $CCR9^+PDCA-1^+SiglecH^+CD9^+$ , la cual, según datos de la literatura correspondería a células dendríticas plasmocitoides productoras de IFN- $\alpha$ . A su vez esta subpoblación celular muestra un fenotipo de DCs activadas, lo que debería incidir en la capacidad de activar linfocitos T y B. Finalmente, observamos que las DCs de ratones lúpicos migran preferencialmente a los

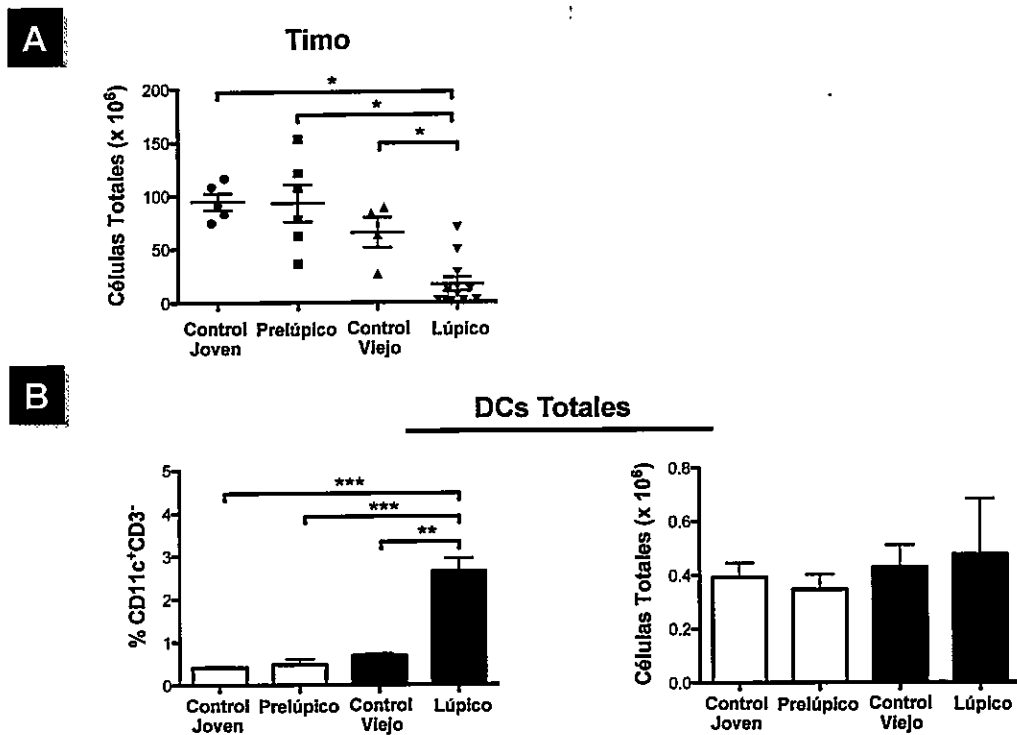
distintos órganos linfoides y se acumulan en el bazo debido probablemente a una mayor resistencia a la muerte celular programada.

#### **4.2. DCs de la periferia migran al timo durante el desarrollo del LES alterando la homeostasis tímica.**

Uno de los órganos importantes para la generación de tolerancia es el timo. Las DCs son responsables de la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a diferentes tipos de linfocitos, entre ellos a linfocitos T reguladores (Treg), por lo cual investigamos qué tipo de DCs se encuentran presentes en el timo de ratones controles, preláupicos y láupicos.

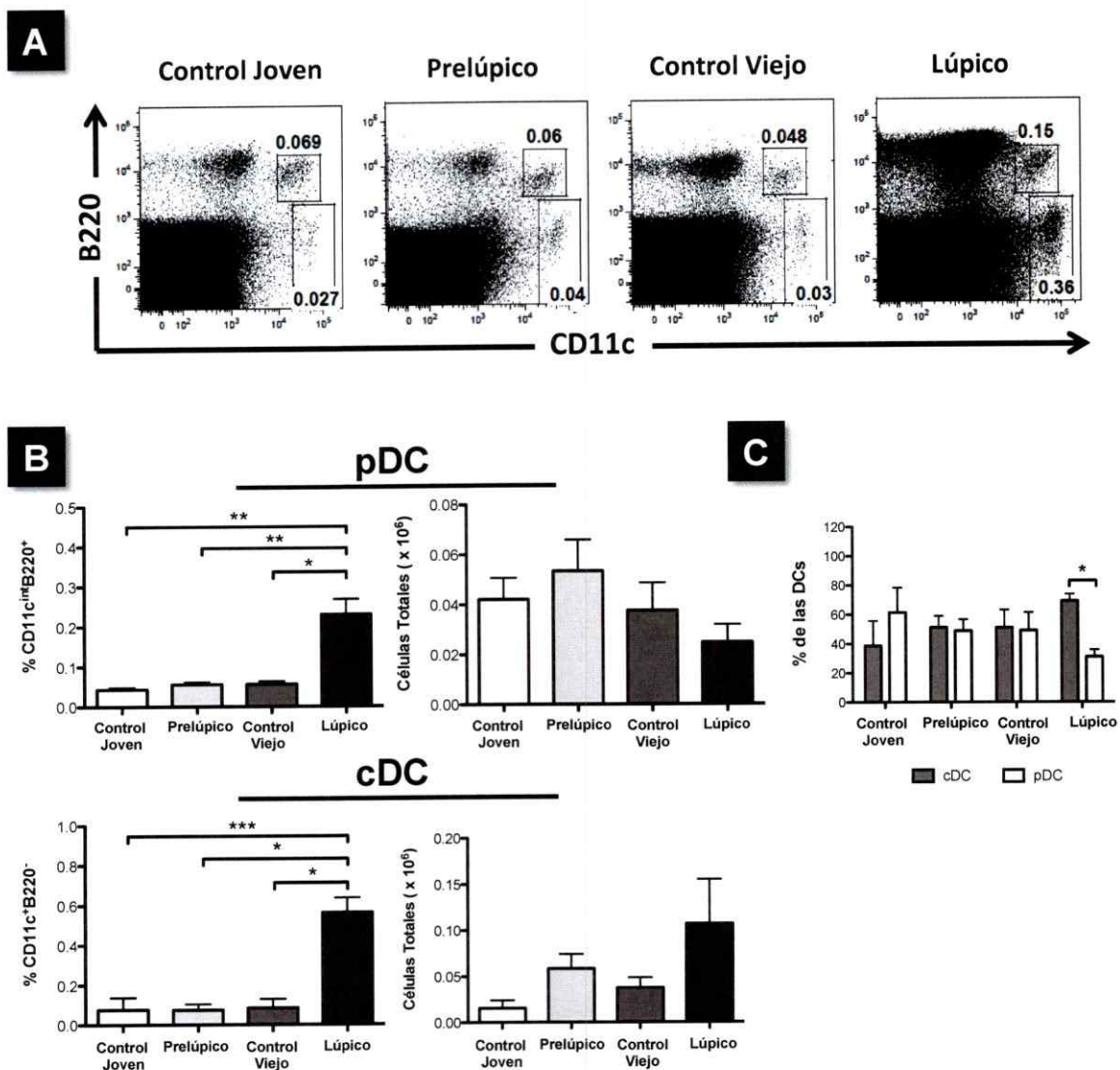
Al analizar los timos de los ratones láupicos encontramos que estos tenían un tamaño muy reducido comparado a ratones controles y preláupicos. En la Figura 7A se muestra el número de células totales en el timo de los grupos de ratones analizados. El timo de los ratones láupicos puede llegar a ser 10 veces menor en tamaño que el timo de ratones jóvenes. Con la edad el timo en ratones sanos se reduce, como se observa con los ratones controles viejos, pero estos ratones rara vez llegan a tener un timo tan pequeño como el de los ratones láupicos.

Al analizar las poblaciones de DCs en el timo, demostramos que el porcentaje de DCs de los ratones láupicos es alrededor de 6 veces más comparado a todos los otros grupos de ratones (Figura 7B). Sin embargo en número absolutos no se observa diferencias debido a la baja celularidad de los timos de los ratones láupicos. La Figura 8A muestra un análisis representativo de al menos 4 experimentos independientes donde se observan las sub-poblaciones de DCs,



**Figura 7. Ratones lúpicos presentan timos con baja celularidad acompañado de un aumento en el porcentaje de DCs totales. A)** Cuantificación del número total de timocitos obtenidos luego de la disgregación del timo y posterior tratamiento con colagenasa y DNAsa. **B)** Los porcentajes de DCs se determinaron mediante citometría de flujo a partir de células CD3<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>. Los números absolutos de DCs se calcularon en base a los porcentajes obtenidos y el número total de células por bazo (A). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células positivas y números absolutos de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de 1 vía con post test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

cDC y pDC, que se encuentran en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. Todos los gráficos ilustrados muestran el mismo número de puntos lo que demuestra claramente que en el timo de los ratones lúpicos hay un mayor número de cDC y pDC comparado a todos los otros grupos de ratones. Observamos además la presencia de una importante cantidad de células B220<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>,

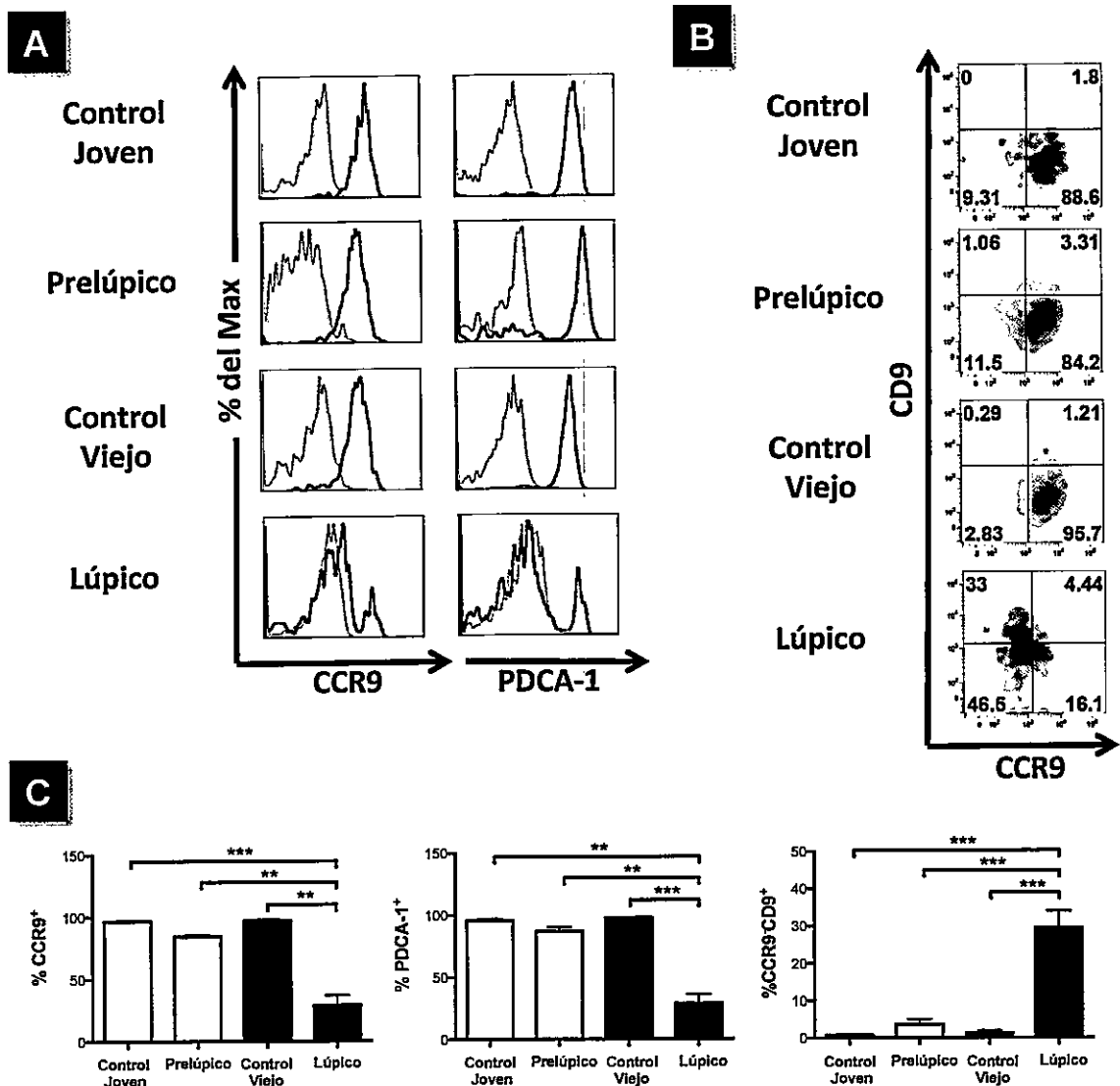


**Figura 8.** El aumento del porcentaje de DCs en el timo de ratones lúpicos se debe a la expansión de DCs convencionales (cDC) y plasmocitoides (pDC). **A)** Análisis de citometría de flujo de las sub-poblaciones cDC (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>) y pDC (CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>) en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. Resultado representativo de al menos 4 experimentos independientes. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. Los números absolutos de cDC y pDC se calcularon en base a los porcentajes obtenidos y el número total de células por timo (análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn's). **C)** Análisis de la proporción de cDC vs pDC. La razón se calculó en base a la suma de los porcentajes obtenidos individualmente para las pDC y cDC. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células positivas y

números absolutos de al menos 4 experimentos independientes (test de ANOVA de 2 vías con post test de Bonferroni). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

probablemente linfocitos B. En la Figura 8B se muestra el análisis estadístico del porcentaje y número absoluto de pDC y cDC presentes en el timo en los distintos grupos de ratones analizados. Observamos que existe un aumento significativo de los porcentajes tanto de cDC como pDC en el timo de ratones lúpicos comparado a ratones controles y prelúpicos. Al evaluar los números absolutos observamos una leve disminución, no significativa, de las pDC y un aumento, tampoco significativo, de las cDC, nuevamente debido al bajo número de células totales de los timos lúpicos. Al evaluar las proporciones de cDC vs pDC en el timo de los ratones analizados observamos que existe una distribución proporcional entre cDC y pDC en el timo de ratones controles y prelúpicos, proporción que se pierde en el caso del timo de ratones lúpicos donde se observa un claro aumento del porcentaje de cDC (Figura 8C). En conjunto estos resultados demuestran una clara pérdida de la homeostasis tímica durante el desarrollo del lupus al observarse la expansión de determinadas poblaciones linfocitarias en desmedro de otras.

Datos de la literatura señalan que en un ratón sano existen tres subpoblaciones de DCs tímicas, una de ellas generada intratímicamente a partir de progenitores comunes de LT y DCs, mientras que las otras dos migran desde la periferia (Li y col. 2009). Por otra parte otro estudio sugiere que las pDCs participarían en la inducción de tolerancia central, para lo cual requieren de la expresión de CCR9 en su superficie para migrar hacia el timo y presentar autoantígenos provenientes de los tejidos periféricos (Hadeiba y col. 2012). En base a estos antecedentes analizamos el fenotipo de las pDC de timo según los

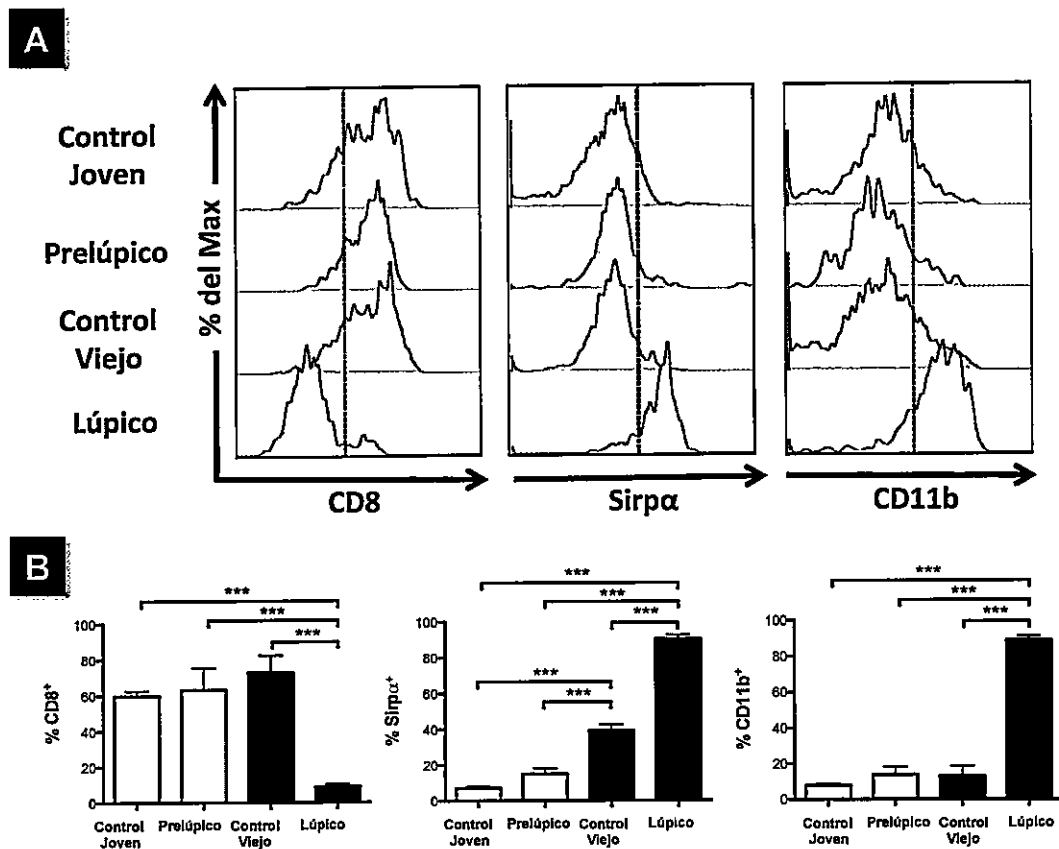


**Figura 9.** Las pDC de timo de ratones lúpico poseen un fenotipo característico de células productoras de IFN- $\alpha$  (CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>SiglecH<sup>-</sup>CD9<sup>+</sup>). **A)** Histogramas de fluorescencia para los marcadores CCR9 y PDCA-1 (línea negra) en una ventana CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup> (pDC) (control de isotipo histograma gris). Se ilustra un experimento representativo de al menos 4 experimentos independientes. **B)** Análisis representativo de citometría de flujo para los marcadores CD9 y CCR9 en una ventana CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>. **C)** Cuantificación de los resultados mostrados en A y B. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células positivas de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn's. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

marcadores CCR9, PDCA-1 y CD9. La Figura 9A muestra un ejemplo representativo de los histogramas para los marcadores analizados en pDC de timo de los distintos ratones y se observa que las pDC de ratones sanos y controles expresan en su totalidad los marcadores CCR9 y PDCA-1, en comparación a pDC de ratones lúpicos. La cuantificación de la subpoblación positiva para estos marcadores (Figura 9C) muestra que el porcentaje de estas células disminuye drásticamente en las pDC de timo de los ratones lúpicos. Por otra parte, el análisis de la expresión de CD9 muestra que la subpoblación de pDC que expresa este marcador es negativa para CCR9 (Figura 9B) y que el porcentaje de células CD9 positivas aumenta significativamente en las pDC de timo de los ratones lúpicos (Figura 9C). Se observa que las pDC de timo de ratones lúpicos presentan el mismo fenotipo de las pDC de bazo de ratones lúpicos caracterizado como CCR9<sup>-</sup> PDCA-1<sup>-</sup> CD9<sup>+</sup>, sugiriendo tal como indica la literatura, que las pDC de timo provienen de la periferia. Estos resultados concuerdan con la literatura en cuanto a la participación de CCR9 para la migración de pDC hacia el timo, requerimiento que se pierde en el caso de pDC en un contexto de autoinmunidad.

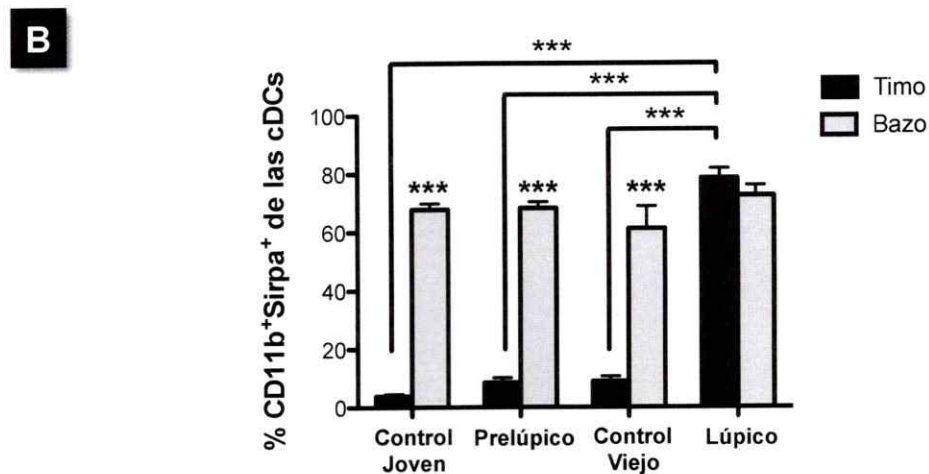
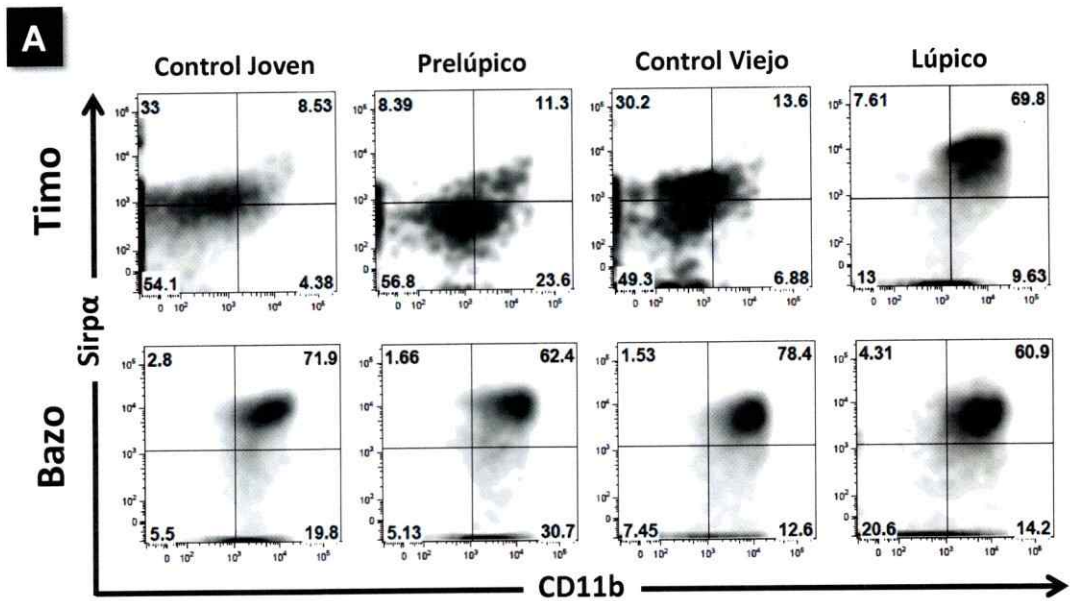
Las cDC del timo se diferencian por su origen extra o intratímico, donde la primera se caracteriza por el fenotipo cDC Sirpα<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, mientras que las DCs intratímicas consistirían en cDC Sirpα<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (Li y col. 2009). Con dichos antecedentes procedimos a evaluar las distintas sub-poblaciones de cDC en el timo de los ratones controles, prelúpicos y lúpicos. La Figura 10A muestra claramente la diferencia en las sub-poblaciones de cDC presentes en el timo de ratones controles y lúpicos. La Figura 10B muestra el análisis estadístico del conjunto de resultados obtenidos para los marcadores analizados. En dicha figura se muestra que en el timo de ratones controles y prelúpicos la gran mayoría de





**Figura 10.** Las cDC de timo de ratones lúpicos poseen un fenotipo característico de células migratorias provenientes de la periferia ( $Sirp\alpha^+CD11b^+CD8^-$ ). **A)** Histogramas de fluorescencia para los marcadores CD8, Sirp $\alpha$ , y CD11b en una ventana CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> (cDC). Se ilustra un experimento representativo de al menos 4 experimentos independientes. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células positivas de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA de 1 vía con post test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

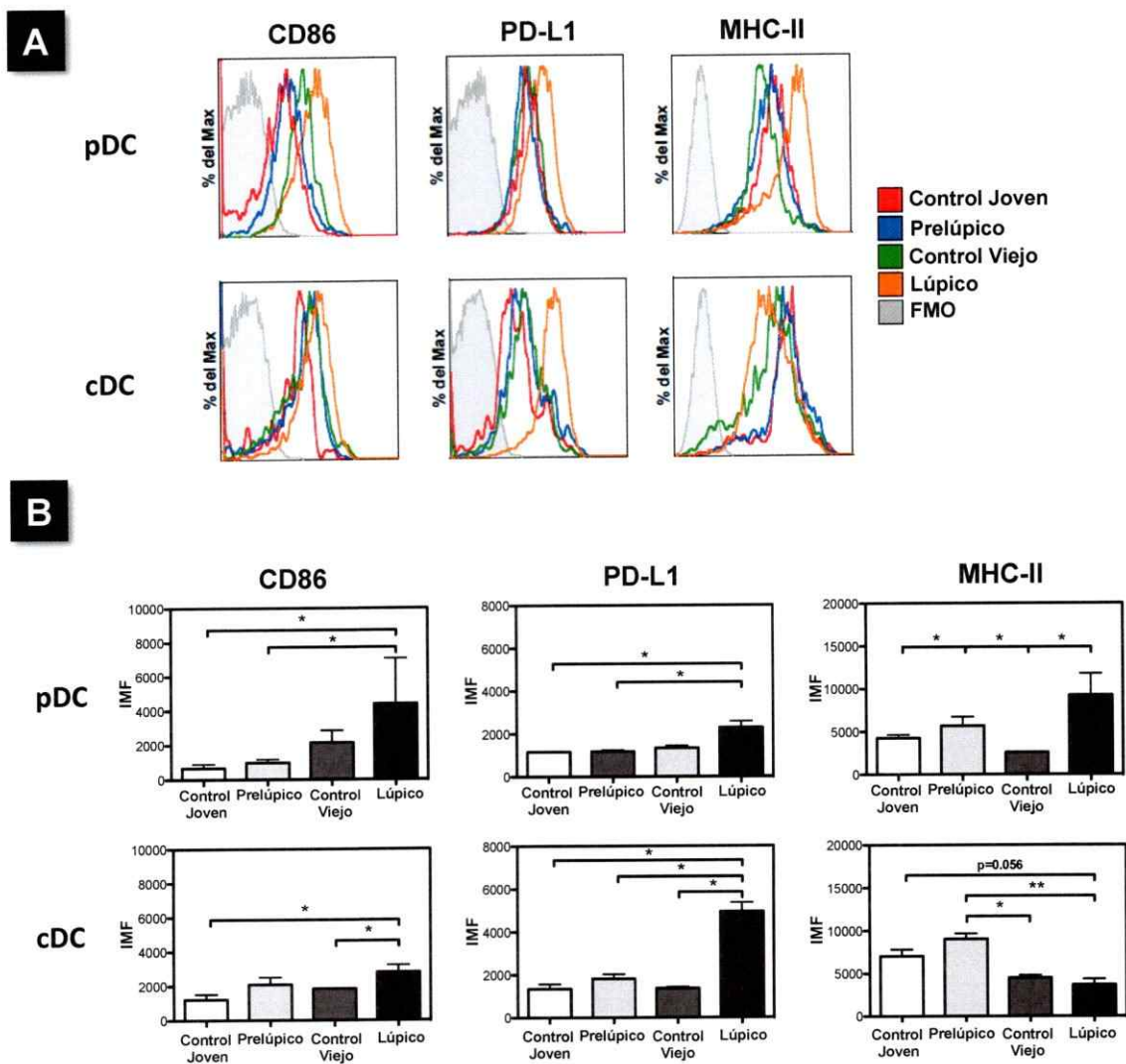
las cDC tienen un origen intratímico dado su marcaje positivo para CD8 y falta de los otros dos marcadores. Contrario a esto, sólo un pequeño porcentaje de cDC del timo de ratones lúpicos serían generadas en el timo, siendo casi el 90% provenientes de la periferia. Estos resultados indican que durante el desarrollo del lupus existe una masiva migración de DCs, tanto pDC como cDC desde la periferia



**Figura 11. cDC del timo de ratones lúpicos poseen el mismo fenotipo que las cDC del bazo. A)** Análisis de citometría de flujo para los marcadores Sirpa y CD11b en una ventana CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> (cDC) en el timo y bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. Resultado representativo de al menos 4 experimentos independientes. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células dobles positivas de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA de 2 vías con post test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

hacia el timo. Para confirmar el origen de las cDC presentes en el timo, se compararon las cDC de timo y bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. La Figura 11A muestra un ejemplo representativo del análisis de citometría de los marcadores Sirpα y CD11b realizado sobre una ventana CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> (cDC) tanto en el timo como el bazo de los ratones analizados. Aquí podemos observar que las cDC de timo y bazo muestran un marcaje similar para Sirpα y CD11b. La Figura 11B muestra el análisis estadístico del conjunto de resultados obtenidos para los marcadores analizados. En dicha figura se observa que las cDC de bazo en todos los ratones analizados poseen el fenotipo de cDC migratoria (Sirpα<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) y que solo una pequeña población de éstas se encuentra en el timo de ratones controles y lúpicos, mientras que en el timo de ratones lúpicos las cDC provendrían casi en su totalidad de la periferia.

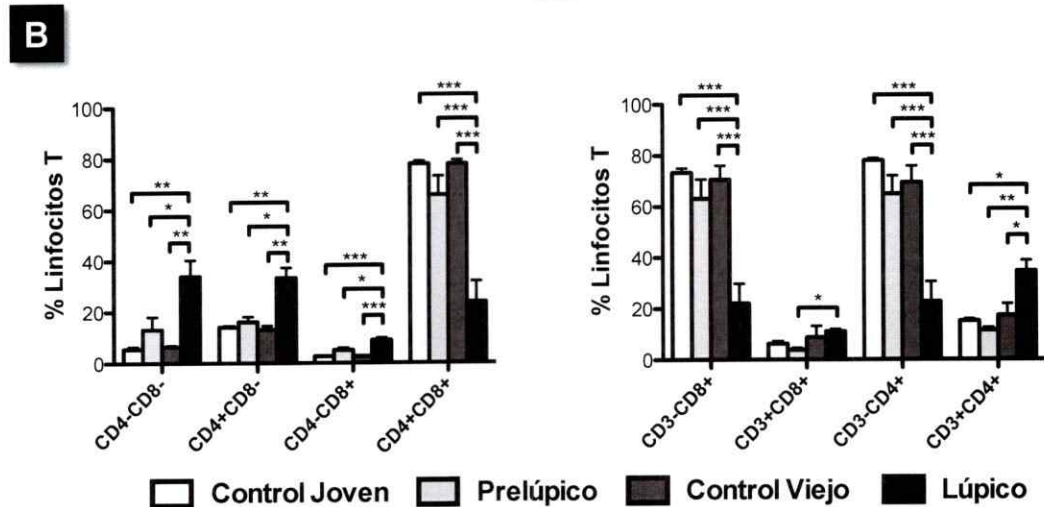
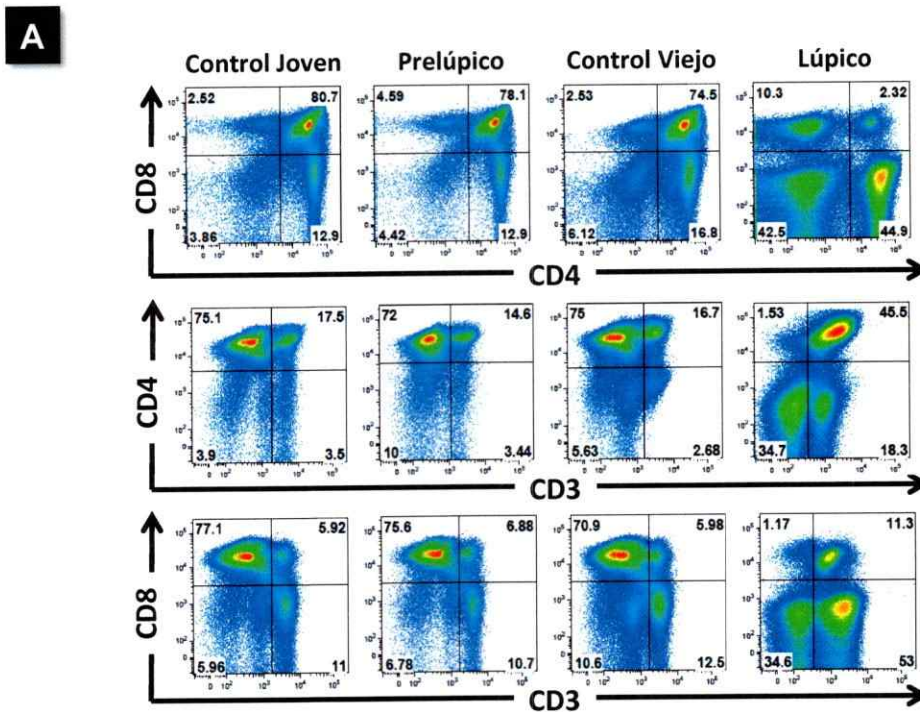
Como ya indicamos anteriormente, la funcionalidad de las DCs está dada en parte por la expresión de moléculas de coestimulación en su superficie las que finalmente determinan si se genera una respuesta de inmunidad o tolerancia. Para evaluar la capacidad de las pDC y cDC de timo para generar tolerancia mediante la diferenciación de LT a LT reguladores, determinamos la expresión de las moléculas de coestimulación CD86 y PD-L1 y la molécula presentadora de antígeno MHC-II. La Figura 12A muestra un ejemplo representativo de la superposición de histogramas para cada uno de los marcadores de activación evaluados en cDC y pDC de timo en ratones controles, prelúpicos y lúpicos. La Figura 12B muestra el análisis estadístico de las intensidades medias de fluorescencia (IMF), provenientes de al menos 4 experimentos independientes, para los distintos marcadores analizados. Observamos que las pDC de ratones lúpicos expresan altos niveles de MHC-II en comparación a pDC provenientes de



**Figura 12. Células dendríticas (DCs) provenientes del timo de ratones lúpicos presentan un fenotipo activado comparado a DCs de ratones prelúpicos y controles. A)** Superposición de histogramas de fluorescencia para los marcadores de activación CD86, PD-L1 y MHC-II en una ventana  $CD11c^+B220^-$  (cDC) y  $CD11c^{int}B220^+$  (pDC). Resultado representativo de al menos 4 experimentos independientes. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn's. \* $p < 0.05$

ratones controles, mientras que sólo se observa un leve tendencia en comparación a pDC de ratones prelúpicos. En el caso de los marcadores de activación CD86 y PD-L1 observamos que pDC de timo de ratones lúpicos presentan un aumento significativo de estos marcadores en comparación a pDC de timo de ratones controles y prelúpicos, pero sólo un leve aumento respecto a pDC de ratones controles viejos, indicando que dicho fenómeno podría ser causado por la edad. Por otra parte las cDC del timo de ratones lúpicos presentan una alta expresión de la molécula de coestimulación PD-L1 en comparación a ratones controles y prelúpicos. Sin embargo el aumento en la expresión de CD86 sólo fue comparativo con ratones controles. Además cDC de timo de ratones lúpicos presentan una disminución en la expresión de MHC-II en comparación a ratones controles jóvenes y prelúpicos pero no con ratones controles viejos, lo que nuevamente podría ser indicativo de un fenómeno debido a la edad. En general se observa que las pDC y cDC de timo de ratones lúpicos se encuentran activadas en comparación a ratones de temprana edad.

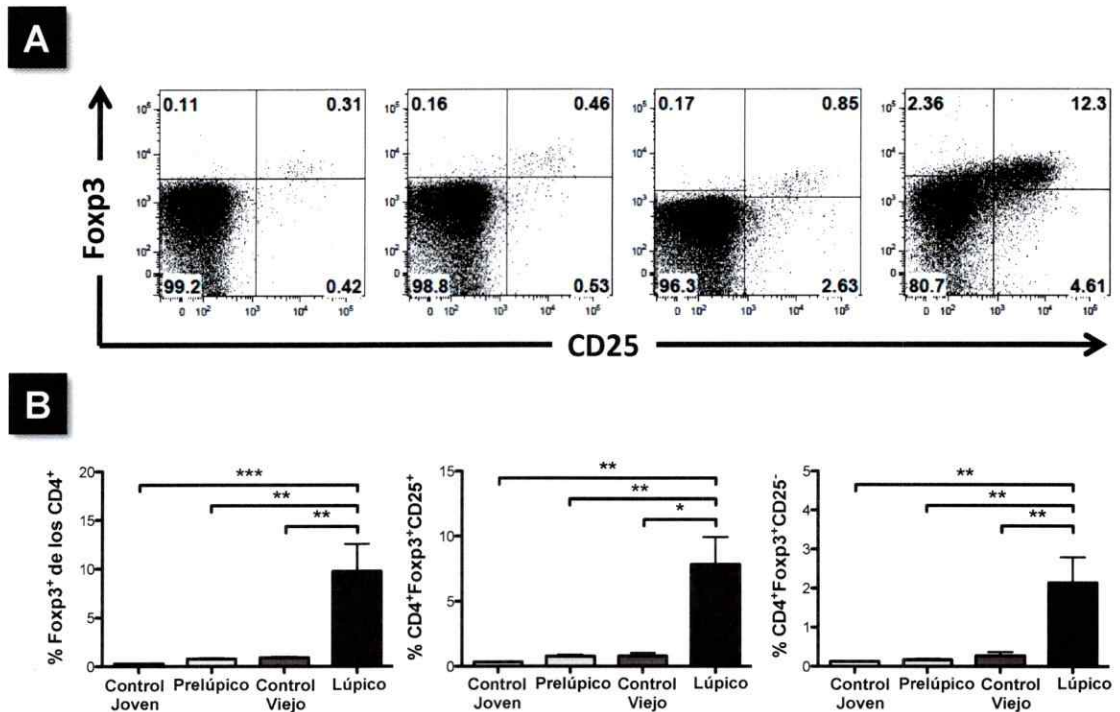
La involución tímica y migración anormal de DCs al timo durante el desarrollo del lupus son claros indicativos de una pérdida de la homeostásis en este órgano. Además, mediante el análisis de distintos marcadores de linfocitos T detectamos que existe una pérdida casi de la totalidad de LT CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP; Doble Positivo) en el timo de ratones lúpicos (Figura 13A y B) lo cual explica en gran medida la baja celularidad observada (Figura 7A). Por otra parte existe un aumento del porcentaje de LT dobles negativos (DN; Doble Negativo), es decir que no expresan CD4 ni CD8 y que son precursores de LT. Este fenómeno ya había sido reportado en el modelo murino BWF1 utilizado en este trabajo (Ishikawa y col. 2001). También observamos que tanto los LT CD8<sup>+</sup> como LT CD4<sup>+</sup> remanentes del timo



**Figura 13. La baja celularidad del timo de ratones lúpicos se debe a la pérdida de LT inmaduros ( $CD4^+CD8^+$ ). A)** Análisis de citometría de flujo de las sub-poblaciones de LT según los marcadores CD3, CD4 y CD8 en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. Resultado representativo de al menos 4 experimentos independientes. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células positivas de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de 2 vías con post test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

de ratones lúpicos poseen un fenotipo más maduro que los LT de timo de ratones controles y prelúpicos dado que expresan el marcador CD3 que es parte del complejo del TcR.

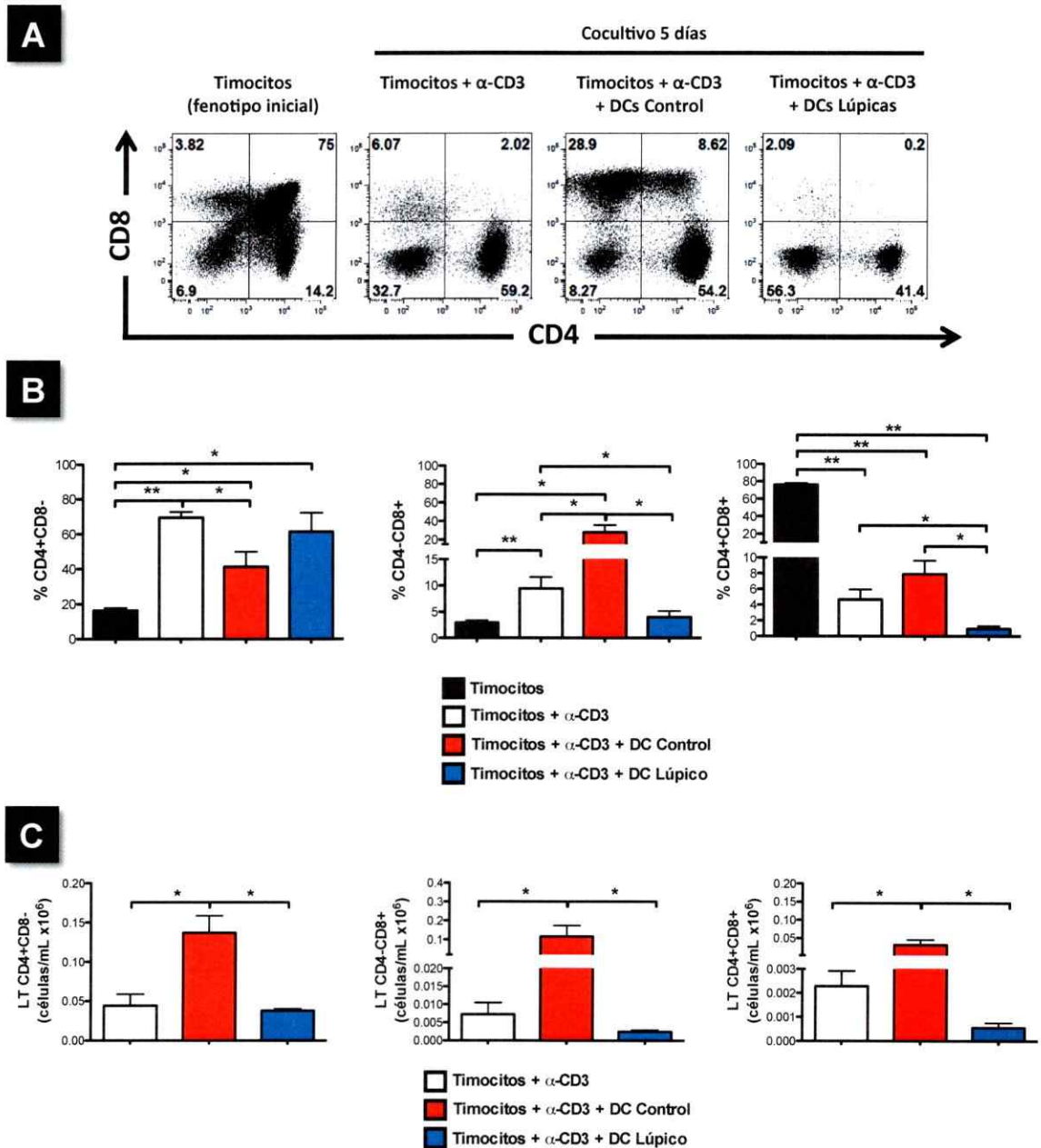
Por otro lado se ha determinado que el timo de ratones lúpicos posee un mayor porcentaje de LTreg, tanto de la subpoblación CD25 positiva como negativa en comparación al timo de ratones controles y prelúpicos (Reyes 2011). Dichos resultados fueron corroborados en el presente estudio y se ilustran en la Figura 14A y B. El aumento del porcentaje de DCs en el timo de los ratones lúpicos podría estar relacionado con la generación de LTreg intratímicos o con la delección clonal como mecanismos compensatorios del sistema en un intento de restaurar la tolerancia. Con el objetivo de dilucidar la función de las DCs en el timo de ratones lúpicos se realizaron experimentos de co-cultivos donde se utilizaron timocitos depletados de APC provenientes de ratones controles y se cultivaron en presencia o ausencia de DCs purificadas a partir del timo de ratones controles o lúpicos. Debido al bajo porcentaje de cDC y pDC en los timos de los ratones controles, se decidió purificar células dendríticas totales del timo de ratones controles y lúpicos mediante *cell sorter*. La Figura 15A muestra un ejemplo representativo del análisis de citometría del repertorio de LT SP (Single Positivo) y DP (Doble Positivo) en los timocitos antes y después del co-cultivo con DCs totales de timo de ratones controles y lúpicos. La Figura 15B y C muestra el análisis estadístico del conjunto de resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes para el porcentaje y número absoluto de las poblaciones de LT. Lo primero que observamos es que DCs de timo de ratones controles son necesarias para la diferenciación de LT DP a LT CD8<sup>+</sup> SP. Observamos que los LT CD4<sup>+</sup> SP proliferan en ausencia o presencia de DCs tímicas, independiente del origen de



**Figura 14. El timo de ratones lúpicos presenta un mayor porcentaje de LTregs comparado a ratones controles y prelúpicos. A)** Análisis de citometría de flujo de la expresión de Fxp3<sup>+</sup> y CD25 en LT CD4<sup>+</sup> del timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos. Citometría de flujo representativa que muestra la expresión de Fxp3 y CD25 en una ventana CD4<sup>+</sup> para los distintos ratones analizados. Los números al interior de cada gráfico representan el porcentaje de células en cada cuadrante. Resultados representativos de al menos 4 experimentos independientes. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células positivas de al menos 4 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn's. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

éstas últimas. Además DCs de timo de ratones controles ayudan a la mantención de la población de LT DP, la cual se pierde casi en su totalidad en ausencia de DCs. El bajo porcentaje de LT DP se puede deber a que éstos no expresan en su superficie CD3 y por ende no son capaces de activarse con el anticuerpo anti-CD3.





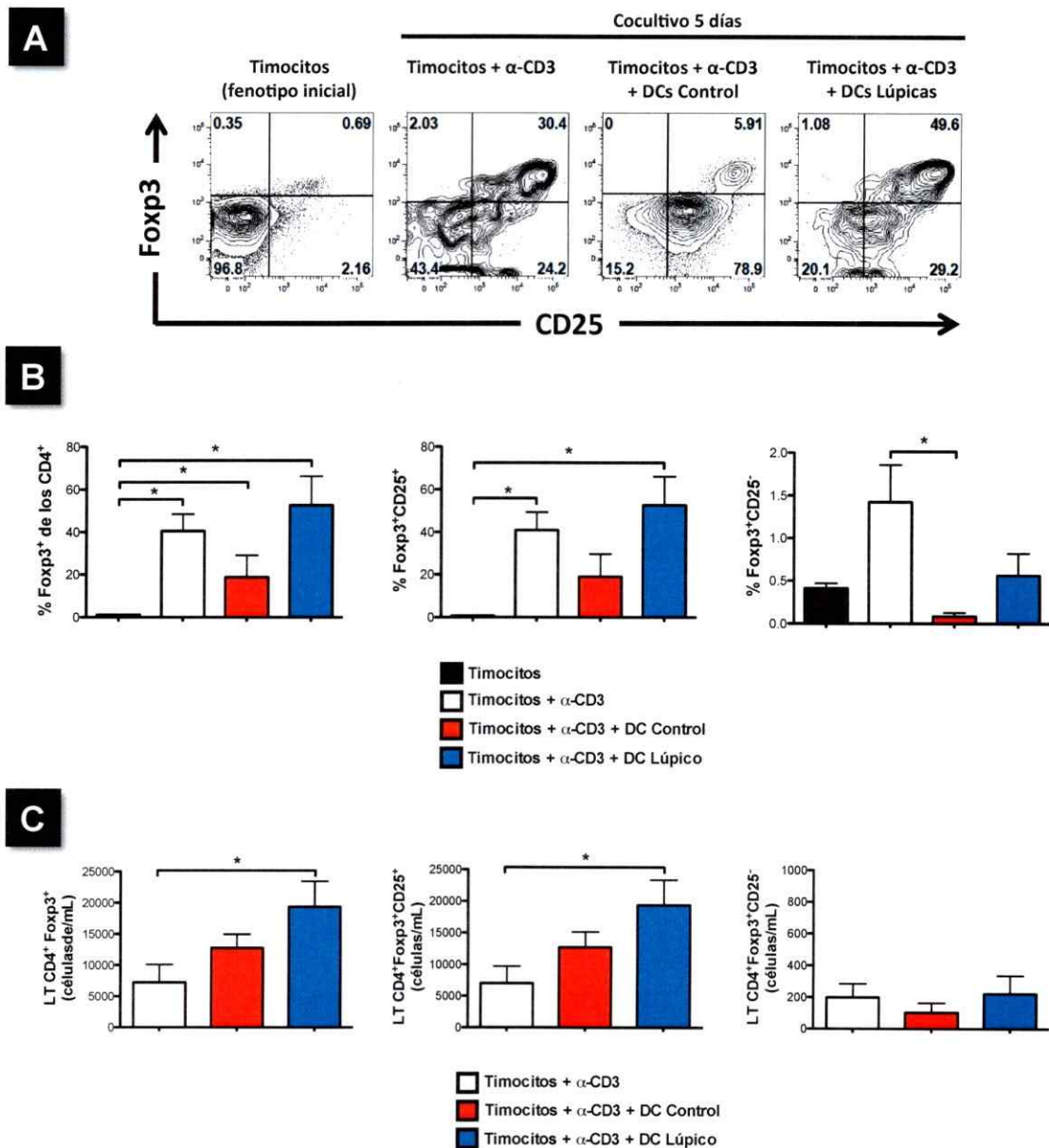
**Figura 15. DCs del timo de ratones lúpicos impiden la selección positiva de LT DP a LT CD8<sup>+</sup> SP.** A) Análisis de citometría de flujo de las sub-poblaciones de LT según los marcadores CD4 y CD8 de timocitos de ratones controles cultivados con DCs de timo de ratones controles y lúpicos. Resultado representativo de 3 experimentos independientes. B) Cuantificación de los resultados mostrados en A. C) Cuantificación de los números absolutos de LT por mL calculados en base a los porcentajes obtenidos (B) y el número total de células/mL obtenidos por condición. Las barras representan el promedio  $\pm$  error

estándar de los porcentajes de células positivas. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn's. \* $p < 0.05$

Por otro lado, DCs de timo de ratones lúpicos no son capaces de mantener la sobrevivencia de LT DP, observándose los mismos resultados que en el co-cultivo sin DCs. Es más, la disminución de los porcentajes de la población de LT DP es incluso menor al co-cultivar los timocitos con las DCs de timo de ratones lúpicos, sugiriendo que las DCs de timo de ratones lúpicos inducirían la muerte de dicha población. Estos resultados claramente sugieren la pérdida de capacidades funcionales en las DCs de timo de ratones lúpicos.

A continuación evaluamos el efecto de las DCs sobre la generación o amplificación de LTreg. La Figura 16A muestra un ejemplo representativo del análisis de citometría de las poblaciones de LTreg totales y según su expresión de CD25 en timocitos CD4<sup>+</sup> luego del co-cultivo con DCs de timo de ratones controles o lúpicos. La Figura 16B y C muestra el análisis estadístico del conjunto de resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes para el porcentaje y número absoluto de las poblaciones de LTreg. Posterior al co-cultivo observamos que la población de LTreg inicial se expande en presencia o ausencia de DCs. Las DCs de timo de ratones controles inhiben la proliferación o expansión de los LTreg. Análisis del perfil de citoquinas liberados al medio en las distintas condiciones de co-cultivo muestran que las DCs de timo de ratones lúpicos inducen una baja secreción de las distintas citoquinas analizadas en comparación a las condiciones con DCs de timo de ratones controles (Figura 17).

En conjunto estos resultados sugieren que en un estado normal las DCs del timo reprimen la expansión de LTreg y participan en la maduración de LT CD8<sup>+</sup>

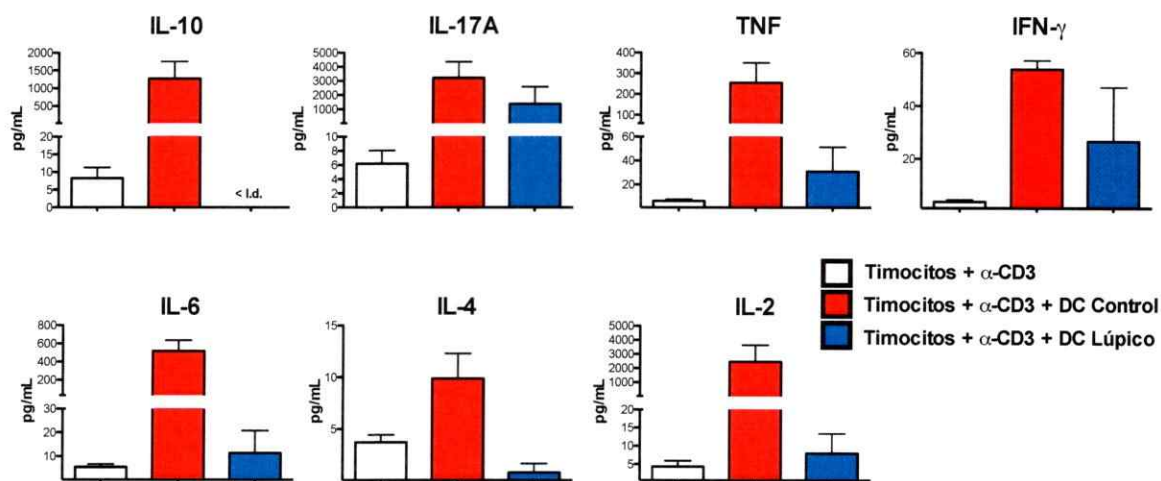


**Figura 16.** DCs provenientes del timo de ratones lúpicos poseen una mayor capacidad de generar LTreg a partir de timocitos de un ratón control en comparación a DCs de timo de ratones controles. A) Análisis de citometría de flujo de la expresión de Fxp3 y CD25 en LT CD4<sup>+</sup> del timo de ratones controles cultivados con DC de timo de ratones controles y lúpicos. Citometría de flujo representativa que muestra la expresión de Fxp3 y CD25 en una ventana CD4<sup>+</sup>. Los números al interior de cada gráfico representan el porcentaje de células en cada cuadrante. Resultados representativos de 3 experimentos

independientes. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. **C)** Cuantificación de los números absolutos de LTreg por mL calculados en base a los porcentajes obtenidos (B) y el número total de células/mL obtenidos por condición. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de los porcentajes de células positivas de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn's. \* $p < 0.05$

SP, mientras que en un contexto de autoinmunidad las DCs del timo pierden esta capacidad permitiendo la expansión anormal de los LTreg.

En resumen, determinamos que durante el desarrollo del lupus las DCs aumentan su migración hacia el timo donde, debido a cambios fenotípicos y funcionales pierden su capacidad de regular la proliferación de LTreg permitiendo su expansión en desmedro de la población de LT DP.

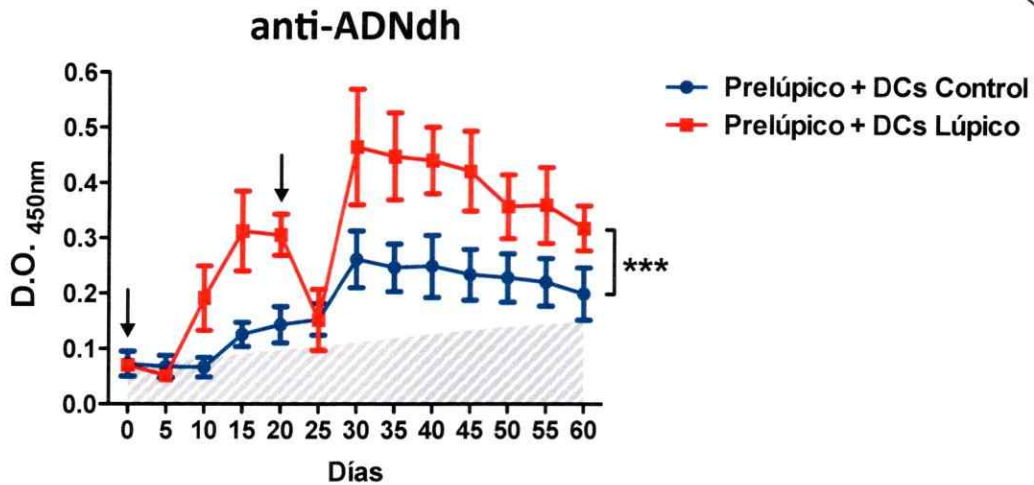


**Figura 17. Patrón de citoquinas obtenido de los cultivos de timocitos de ratones controles con DCs de timo de ratones lúpicos y controles.** Un panel de citoquinas fueron evaluadas mediante CBA en los sobrenadantes de los cultivos entre timocitos y DC de timo de ratones lúpicos y controles. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la concentración de citoquinas de 3 experimentos independientes. <l.d. : valores inferiores al límite de detección.

### **4.3. Rol *in vivo* de las DCs durante el LES: Transferencia adoptiva de DCs de bazo de ratones controles o lúpicos a ratones prelúpicos.**

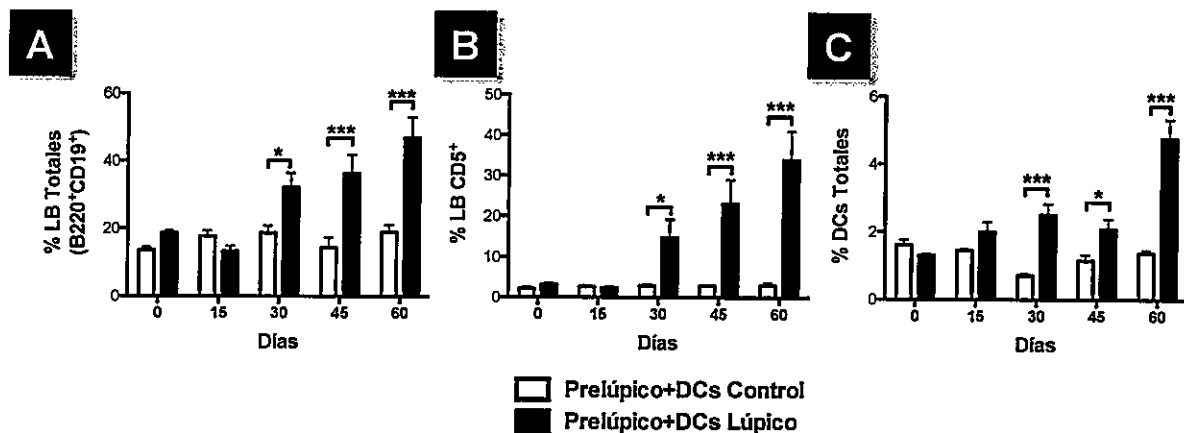
En la búsqueda del rol *in vivo* de las DCs durante el desarrollo de lupus realizamos ensayos de transferencia adoptiva de DCs purificadas a partir del bazo de ratones lúpicos a ratones prelúpicos sanos. El objetivo de dicho experimento fue determinar si las DCs de ratones lúpicos por si solas son capaces de inducir o acelerar el proceso de autoinmunidad en ratones sanos de la misma cepa BWF1. Dado que el ciclo de vida de las DCs es corto (Kamath y col. 2002) y nuestro objetivo buscaba efectos a largo plazo, el protocolo consideró dos inyecciones de  $4,5 \times 10^6$  DCs una al día cero y la siguiente al día 20 (Figura 1B). Durante 60 días se realizaron mediciones de proteinuria, autoanticuerpos en el suero y se tomaron muestras de sangre para evaluar el fenotipo de distintas poblaciones linfoides.

La Figura 18 muestra que la inyección de DCs en ratones prelúpicos induce la producción de autoanticuerpos anti-ADNdh. Dicho efecto es notablemente mayor cuando las DCs inyectadas provienen de ratones lúpicos. Cabe destacar la disminución en el título de anticuerpos anti-ADNdh observado al día 25 en el tratamiento con DCs de ratones lúpicos. Dicha disminución va de la mano con lo expuesto anteriormente respecto al ciclo de vida de las DCs dentro del organismo. Por otra parte los ratones sometidos a estos tratamientos no experimentaron aumento del a proteinuria, a pesar de los altos niveles de auto-anticuerpos en los sueros. Dicho resultado sugiere que el daño renal requiere de la acumulación progresiva de inmunocomplejos.



**Figura 18. DCs de bazo de ratones lúpicos inducen la producción de autoanticuerpos contra ADNdh en ratones prelúpicos.** Anticuerpos anti-ADN de doble hebra (ADNdh) fueron evaluados cada 5 días durante 2 meses mediante ELISA en el suero de los ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones control o lúpicos. Los sueros se evaluaron a una dilución de 1/250 (dilución previamente estandarizada). En azul se muestran los resultados obtenidos para el grupo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles (n=4) y en rojo los resultados obtenidos para el grupo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos (n=4). El área gris achurada ilustra los títulos de anticuerpos anti-ADNdh en ratones prelúpicos no tratados. Las flechas en los días 0 y 20 indican las 2 inyecciones de DCs realizadas. El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de 2 vías con post test de Bonferroni. Los asteriscos ilustrados entre ambas curvas indica diferencia significativa entre la inyección con DCs de ratones controles vs DCs de ratones lúpicos. \*\*\*p<0.0001. D.O. : Densidad Óptica.

En relación al aumento de auto-anticuerpos, observamos un fuerte aumento de linfocitos B en sangre de los ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones lúpicos comparado a aquellos inyectados con DCs de ratones controles (Figura 19A). Un análisis más profundo de los linfocitos B permitió determinar que dicho aumento se debe a la expansión de LB caracterizados como CD19<sup>+</sup>B220<sup>int</sup>CD5<sup>+</sup>, conocidos como linfocitos B1 (Figura 19B). A la vez, observamos una expansión de las DCs endógenas en los ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones



**Figura 19.** DCs de bazo de ratones lúpicos inducen un aumento en el tiempo de los Linfocitos B totales (LB), LB CD5<sup>+</sup> y DCs totales en sangre de ratones prelúpicos. Los gráficos de barra representan los porcentajes de (A) LB Totales (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), (B) LB CD5<sup>+</sup> (B220<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) y (C) DCs Totales (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>). Los gráficos de barra representan el promedio ± error estándar de los porcentajes de células positivas (n=4 por grupo experimental). El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas. \*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001.

lúpicos, aumento más notorio entre los días 45 a 60 (Figura 19C). La Figura 20 (A,C,E,G) muestra un ejemplo representativo del análisis, al día 60 post primera inyección, de distintas poblaciones de LB en sangre de los ratones inyectados con DCs de ratones controles y lúpicos. Dichos resultados fueron cuantificados y comparados a los resultados previos obtenidos para las mismas poblaciones en sangre de ratones controles, prelúpicos y lúpicos (Figuras 20 B,D,F,H). Observamos que el aumento de DCs y LB, en especial la subpoblación CD5<sup>+</sup>, en sangre es un fenómeno asociado al desarrollo de la enfermedad (Figuras 20B,D,F). A diferencia de lo que encontramos en sangre de ratones lúpicos, observamos que la inyección de DCs de estos ratones gatilla un aumento en el porcentaje de células preplasmáticas (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) en sangre de ratones prelúpicos (Figura 20G y H). Por

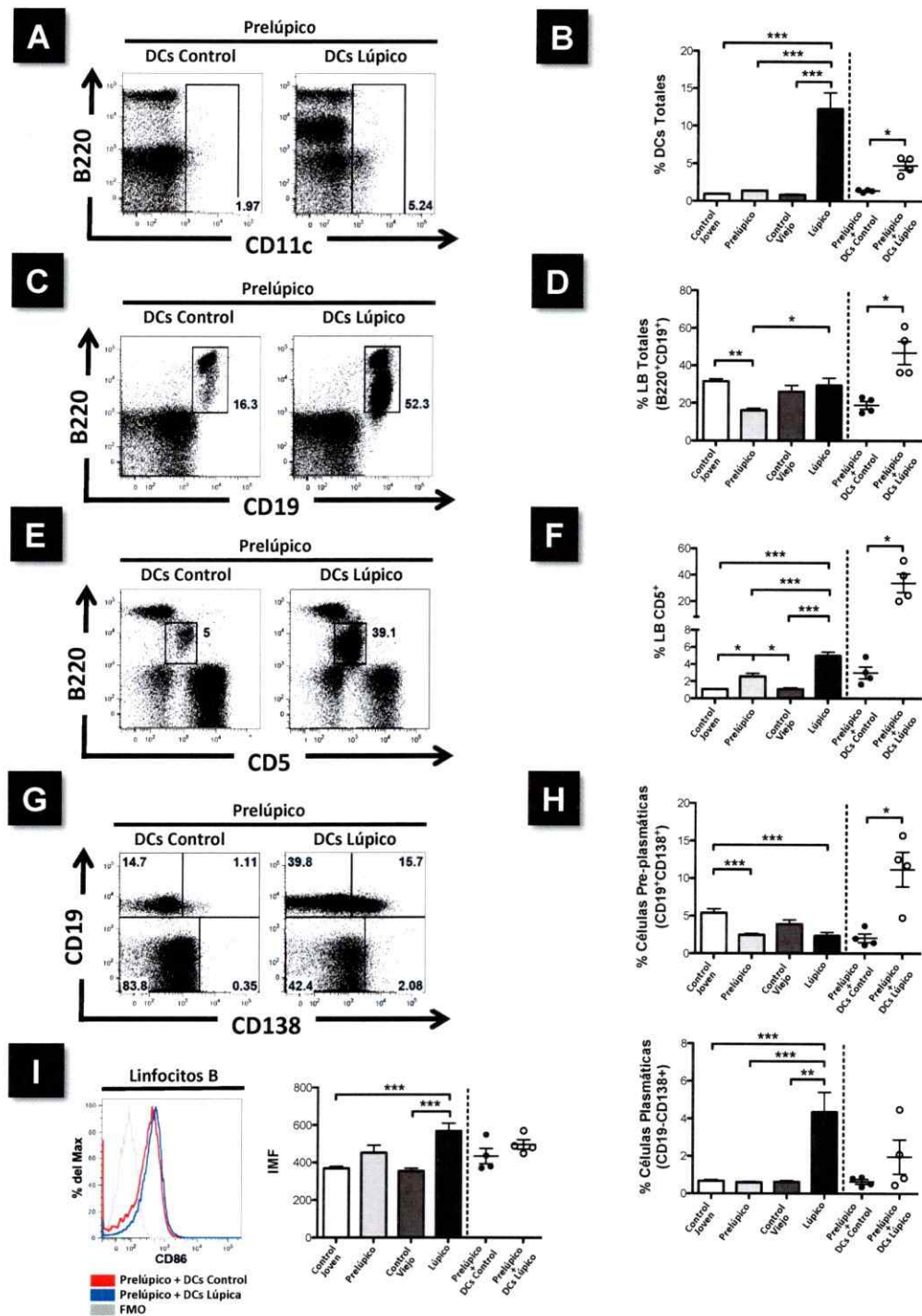


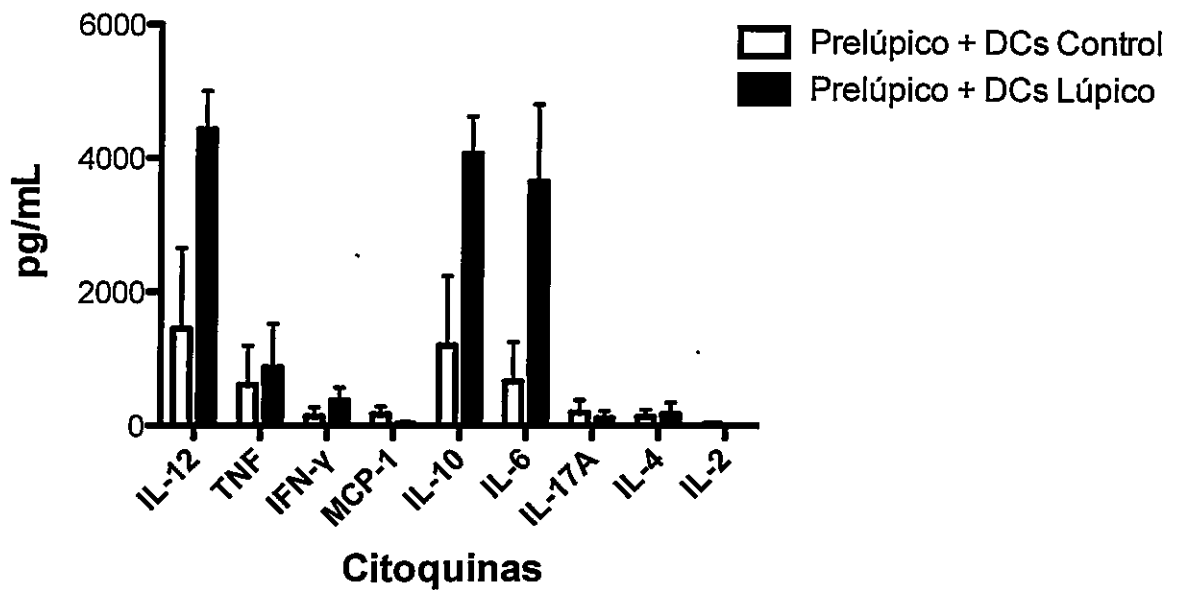
Figura 20. El aumento de LB totales, LB CD5<sup>+</sup> y DCs totales inducido por la transferencia adoptiva de DCs de bazo de ratones es un fenómeno que se observa en sangre de ratones lúpicos. A) Análisis representativo de citometría de flujo de DCs totales (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) en sangre de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones



controles o lúpicos. **C)** Análisis representativo de citometría de flujo de LB totales ( $B220^+CD19^+$ ) en sangre de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. **E)** Análisis representativo de citometría de flujo de LB  $CD5^+$  ( $B220^+CD5^+$ ) en sangre de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. **G)** Análisis representativo de citometría de flujo de células plasmáticas ( $CD19^+CD138^+$ ) y células pro-plasmáticas ( $CD19^+CD138^+$ ) en sangre de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. **B, D, F, H)** Cuantificación de los resultados mostrados en A, C, E, G (gráfico de puntos) (test no paramétrico de Mann-Whitney) y comparados con los porcentajes de dichas poblaciones observadas en sangre de ratones controles, prelúpicos y lúpicos (gráficos de barra) (ANOVA de 1 vía con post test de Bonferroni). **I)** Superposición de histogramas de fluorescencia para el marcador de activación CD86 en una ventana  $B220^+CD19^+$ . A la derecha, cuantificación de los resultados donde los puntos representan el promedio  $\pm$  error estándar de la IMF de CD86 en LB de sangre de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos (test no paramétrico de Mann-Whitney). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la IMF de CD86 en LB de sangre de ratones controles, prelúpicos y lúpicos (ANOVA de 1 vía con post test de Bonferroni). Los resultados ilustrados en gráficos de barra representan al menos 7 experimentos independientes. Los resultados ilustrados en gráficos de puntos contienen un  $n=4$  por grupo experimental. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.0001$ .

otro lado, observamos un leve aumento (no estadísticamente significativo) del porcentaje de células plasmáticas ( $CD19^+CD138^+$ ) en ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones lúpicos (Figura 20G), fenómeno presente en ratones con lupus (Figura 20H). Linfocitos B de sangre de ratones lúpicos presentan un estado activado en comparación a LB de sangre de ratones controles viejos, dicho fenómeno no fue observado al tratar ratones prelúpicos con DCs de ratones lúpicos (Figura 20I).

También se realizaron mediciones de citoquinas en los sueros de los ratones tratados con DCs. En la Figura 21 podemos observar diferencias notorias en los perfiles de citoquinas entre ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones controles o lúpicos. En general se observan mayores niveles de IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e



**Figura 21. Patrón de citoquinas obtenidos a partir del suero de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos.** Un panel de citoquinas fueron evaluadas mediante CBA al día 60 en el suero de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones control o lúpicos. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la concentración de citoquinas de 4 muestras por grupo experimental.

IL-6 en aquellos ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones lúpicos en comparación a aquellos tratados con DCs de ratones controles. Luego de 60 días de seguimiento se sacrificaron los animales para analizar distintas poblaciones linfocitarias en el timo y el bazo y comparar estos datos con lo observado en ratones lúpicos. Al extraer los órganos observamos que 2 de los 4 ratones inyectados con DCs de ratones lúpicos presentaron esplenomegalia, fenómeno asociado al LES (Figura 22A y B). Al igual que lo que se observó en sangre, detectamos un aumento en el porcentaje de DCs totales en el bazo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones lúpicos (Figura 22C arriba). Dicho aumento también fue significativo a nivel de células totales (Figura 22C abajo). El análisis de las sub-poblaciones de

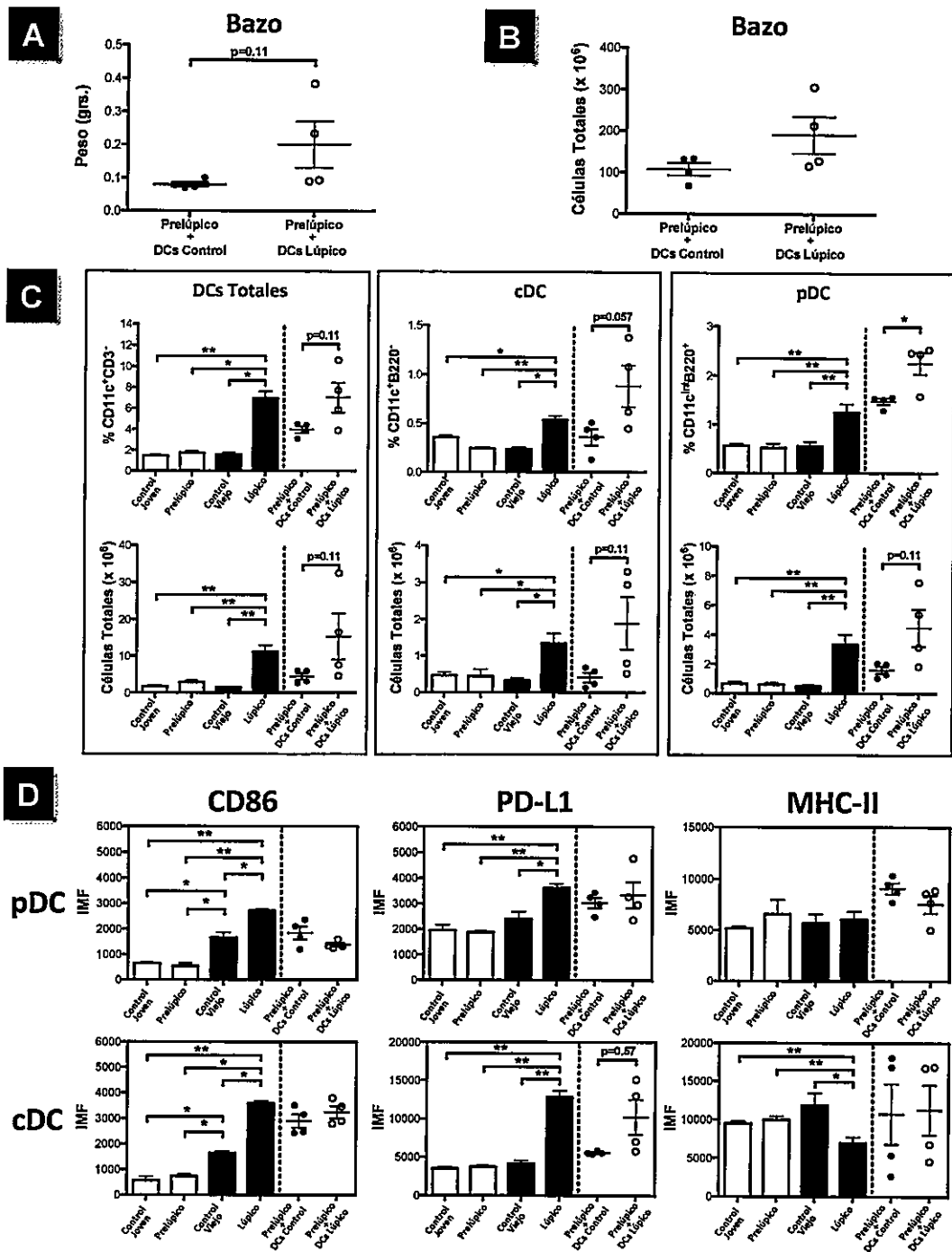


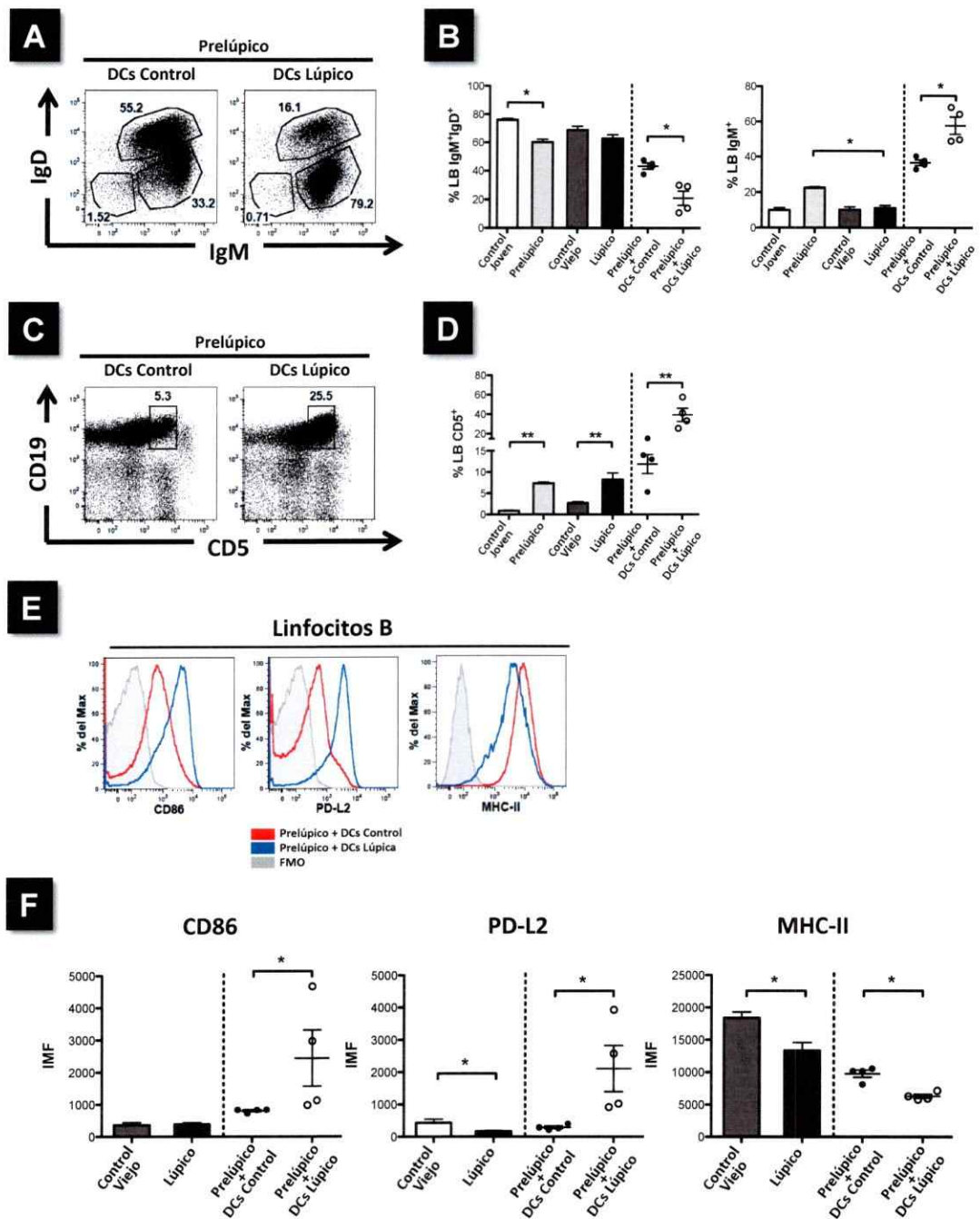
Figura 22. El bazo de ratones prelápicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos presenta un aumento en el porcentaje y número absoluto de DCs. A) Cuantificación del peso por bazo obtenido de los ratones prelápicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. B) Cuantificación del número total de esplenocitos

obtenidos luego de la disgregación del bazo y posterior tratamiento con colagenasa y DNAsa. C) Los porcentajes de DCs se determinaron mediante citometría de flujo, donde las DCs totales se identificaron como CD3<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>, las cDC como CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> y las pDC como CD11c<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>. Los números absolutos de DCs se calcularon en base a los porcentajes obtenidos y el número total de células por bazo (B). Se compararon los resultados con aquellos obtenidos en ratones controles, prelúpicos y lúpicos (gráficos de barra). Las barras representan el promedio ± error estándar de los porcentajes y números absolutos de células positivas para dichos marcadores. D) Análisis del estado de activación de pDC y cDC del bazo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos (gráficos de puntos) comparado con el estado de activación en que se encuentran estas mismas poblaciones en el bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos (gráficos de barra). Las barras representan el promedio ± error estándar de la IMF de los marcadores CD86, PD-L1 y MHC-II. El análisis estadístico en los gráficos de puntos se realizó mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney (n=4 por grupo experimental). El análisis estadístico en los gráficos de barras se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Bonferroni. \*p<0.05, \*\*p<0.001.

DCs demostraron que tanto cDC como pDC se encuentran expandidas en porcentaje y número absoluto en el bazo de ratones inyectados con DCs de ratones lúpicos. Cabe mencionar que la inyección de DCs de ratones controles también aumentó los porcentajes de DCs totales, cDC y pDC sobre el nivel de lo que se encuentra en el bazo de ratones controles o prelúpicos, sin embargo dicho aumento pierde significancia al evaluar los números absolutos de células. Por otro lado no se observaron mayores diferencias en el nivel de activación de cDC y pDC de bazo entre ratones tratados con DCs de ratones controles o lúpicos (Figura 22D). Sin embargo, cabe mencionar que todos los niveles de expresión de las distintas moléculas analizadas (CD86, PD-L1, MHC-II), fueron mayores a los detectados en cDC y pDC de bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos lo que sugiere que la inyección de DCs, independiente de su procedencia, gatilla la activación de las DCs

endógenas. En conjunto estos resultados sugieren que las DCs de ratones lúpicos son capaces de inducir la proliferación y activación de DCs endógenas.

Posteriormente se analizaron las poblaciones de linfocitos B (LB) en el bazo de los ratones tratados con DCs de ratones control o lúpicos. Se detectaron porcentajes normales de LB en el bazo de ambos grupos (datos no mostrados), sin embargo al analizar las sub-poblaciones de LB observamos que la inyección de DCs de ratones lúpicos causa una disminución del porcentaje de LB vírgenes ( $IgM^+IgD^+$ ) que se ve acompañado de un aumento en el porcentaje de LB de memoria  $IgM^+$  (Figura 23A y B). No se observaron diferencias en la población de LB  $IgM^+IgD^-$  (datos no mostrados). Los resultados obtenidos no corresponden a un fenómeno que se observe en el bazo de ratones lúpicos. Por otra parte, y tal como se vio en sangre de los ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones lúpicos, estos ratones mostraron altos porcentajes de LB  $CD5^+$  en el bazo en comparación a aquellos tratados con DCs de ratones controles (Figura 23 C y D). La expansión de LB  $CD5^+$  en el bazo es un fenómeno que se observa en ratones lúpicos comparado a ratones controles viejos. Cabe mencionar que tanto la inyección de DCs de ratones controles como lúpicos gatillaron la expansión de esta subpoblación, que en caso de los ratones tratados con DCs de ratones lúpicos fue significativamente mayor. Finalmente al evaluar el estado de activación de los LB totales de bazo observamos que la inyección de DCs de ratones lúpicos induce su activación (Figura 23E y F). Esto fue determinado al evaluar los niveles de expresión de las moléculas de coestimulación CD86 y PD-L2 en la superficie de los LB de bazo. Cabe destacar que la expresión de CD86 se vio aumentada en LB de bazo de ambos grupos de ratones tratados en comparación a lo que se observa normalmente en bazo de ratones controles viejos y lúpicos, sin embargo el aumento

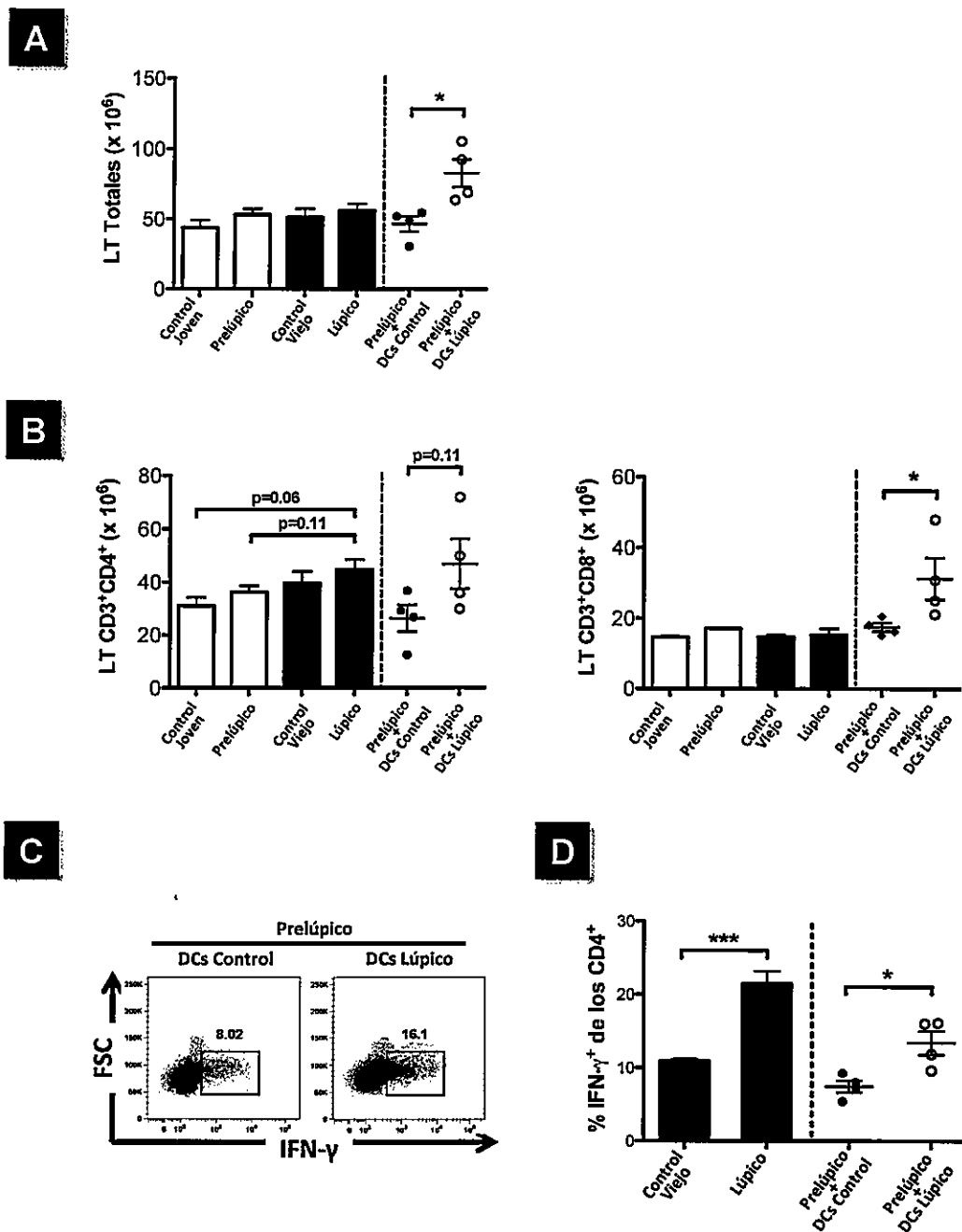


**Figura 23.** El bazo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos presenta una disminución de LB vírgenes y un aumento de LB IgM<sup>+</sup> y LB CD5<sup>+</sup>. **A)** Análisis de citometría de la población de linfocitos B vírgenes (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) y LB IgM<sup>+</sup> dentro de una ventana de LB (CD19<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) en el bazo de los ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. **B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. **C)** Análisis de la población de LB CD5<sup>+</sup> (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) en el bazo de los ratones

prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. D) Cuantificación de los resultados mostrados en C. E) Superposición de histogramas de fluorescencia para los marcadores CD86, PD-L2 y MHC-II en una ventana CD19<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> (LB). F) Cuantificación de los resultados mostrados en E. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney (n=4 por grupo experimental). \*p<0.05.

fue aun mayor en ratones tratados con DCs de ratones lúpicos. Por otro lado se observó una disminución en la expresión de MHC-II en los LB de bazo, independiente del origen de las DCs inyectadas, fenómeno que sí se observa al comparar LB de bazo de ratones controles viejos con lúpicos. Sin embargo la disminución se hace más notoria en aquellos ratones tratados con DCs de ratones lúpicos. En conjunto estos resultados sugieren que las DCs activan a los LB de bazo haciéndolos diferenciarse a LB de memoria (IgM<sup>+</sup>) y aumentan notablemente los LB CD5<sup>+</sup>, fenómeno que se ve exacerbado cuando las DCs provienen de un contexto autoinmune, indicando nuevamente la presencia de diferencias funcionales en las DCs de ratones lúpicos. En conjunto estos resultados sugieren que las DCs de ratones lúpicos participan en la generación de la respuesta humoral autoinmune.

Finalmente se analizaron las poblaciones de linfocitos T (LT) en el bazo de los ratones tratados con DCs de ratones control o lúpicos. La Figura 24 A muestra que existe un aumento en el número absoluto de LT en el bazo de ratones prelúpicos tratados con DCs de ratones lúpicos, fenómeno que no se observó en ratones lúpicos pero que sin embargo si ha sido reportado en ratones con esplenomegalia (Teichmann y col. 2010). Al analizar las dos sub-poblaciones principales de LT observamos que la inyección de DCs de ratones lúpicos gatilló un aumento en el número absoluto de LT CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en el bazo de ratones prelúpicos, siendo éste



**Figura 24.** El bazo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones lúpicos presenta un aumento de los LT totales y LT productores de IFN- $\gamma$ . **A)** Cuantificación del número absoluto de LT CD3<sup>+</sup> en e bazo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos (gráfico de puntos, test no paramétrico de Mann-Whitney) comparados con los números absolutos de LT totales observadas en el bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos (gráfico de barras). **B)** El aumento de LT totales se

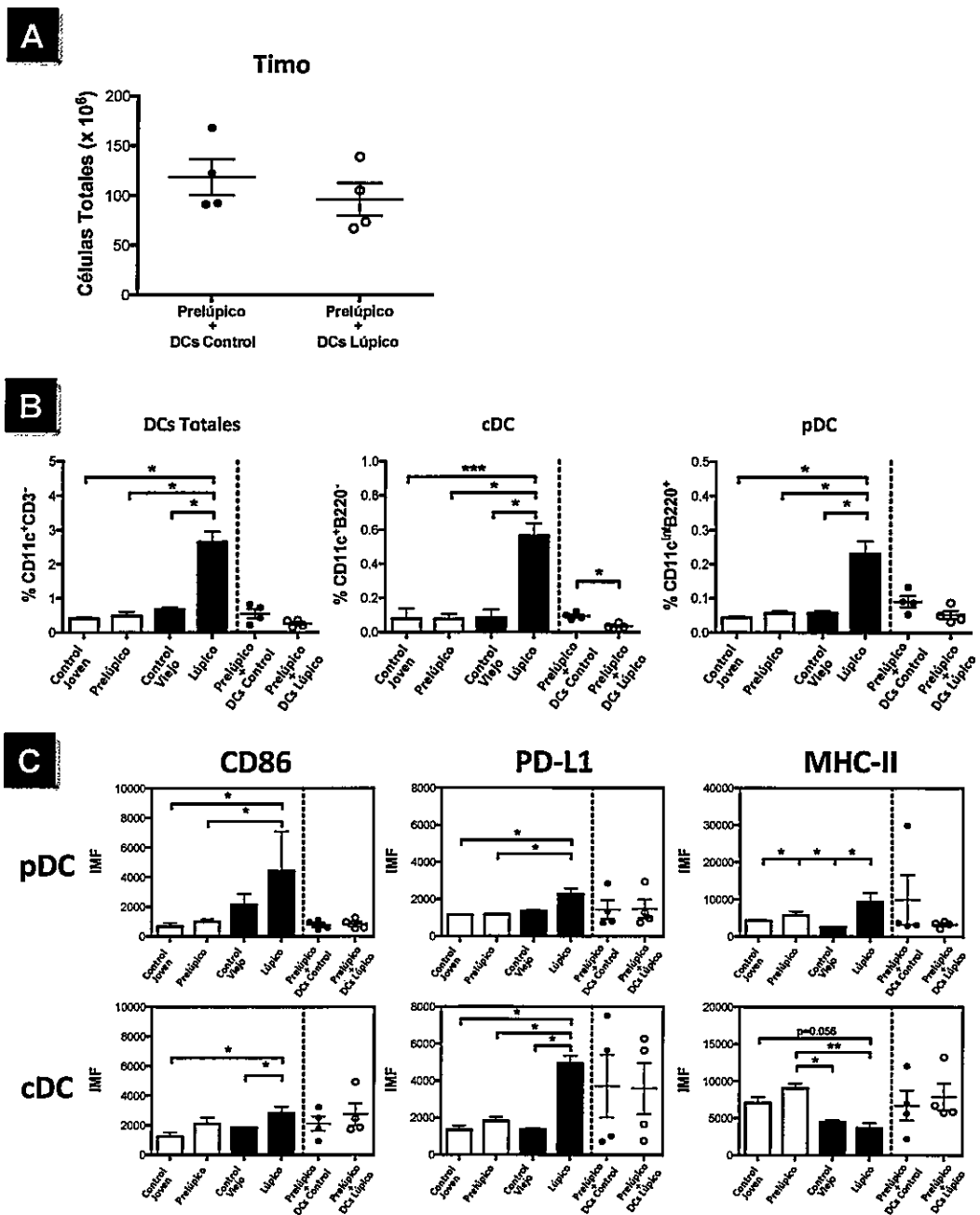


debe a una expansión de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el bazo de ratones inyectados con DCs de ratones lúpicos. Cuantificación del número absoluto de LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y LT CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en el bazo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos (gráfico de puntos, test no paramétrico de Mann-Whitney) comparados con los números absolutos de LT totales observadas en el bazo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos (gráfico de barras). C) Análisis de citometría de la población IFN- $\gamma$  dentro de una ventana de LT CD4<sup>+</sup> en el bazo de los ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos (gráfico de puntos) comparado con los porcentajes de la misma población en bazo de ratones controles y lúpicos (gráfico de barras). D) Cuantificación de los resultados mostrados en C. El análisis estadístico se realizó mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney (n=4 por grupo experimental). \*p<0.05.

último un fenómeno que si fue observado en ratones lúpicos (Figura 24B). Otra característica observable en el bazo de ratones lúpicos es el aumento en el porcentaje de LT con fenotipo Th1, es decir que secretan la citoquina IFN- $\gamma$ . La figura 24 C y D muestra que los ratones prelúpicos inyectados con DC de ratones lúpicos muestran un alto porcentaje de LT IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en comparación a los ratones tratados con DCs provenientes de ratones controles.

En conjunto estos resultados sugieren que las DCs de ratones lúpicos son capaces de inducir la proliferación y expansión de LT, además de su diferenciación hacia LT Th1.

Dado que durante el desarrollo de la enfermedad observamos cambios en el fenotipo y homeostasis de LT y DCs en el timo de ratones lúpicos decidimos analizar los timos de los ratones inyectados con DCs. La Figura 25 muestra el análisis de las DCs en el timo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones controles o lúpicos. En primer lugar observamos que no existen mayores diferencias en la celularidad total de los timos entre ambos grupos de ratones, sugiriendo que las DCs no serían gatillantes del fenómeno de involución tímica



**Figura 25.** El timo de ratones pre-lúpico inyectados con DCs de bazo de ratones lúpico presenta una disminución en el porcentaje de DCs. **A)** Cuantificación del número total de timocitos obtenidos luego de la disgregación del timo y posterior tratamiento con colagenasa y DNasa. **B)** Los porcentajes de DCs en el timo se determinaron mediante citometría de flujo, donde DCs totales se identificaron como CD3<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>, las cDC como CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> y las pDC como CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>. **C)** Análisis del estado de activación de las pDC y cDC del timo de ratones pre-lúpico inyectados con DCs de

bazo de ratones controles o lúpicos (gráficos de puntos) comparado con el estado de activación en que se encuentran estas mismas poblaciones en el timo de ratones controles, prelúpicos y lúpicos (gráficos de barra). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la IMF de los marcadores CD86, PD-L1 y MHC-II. El análisis estadístico en los gráficos de puntos se realizó mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney ( $n=4$  por grupo experimental). El análisis estadístico en los gráficos de barras se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Bonferroni. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.001$ .

(Figura 25A). En la Figura 25B observamos que la inyección de DCs de ratones lúpicos indujo una disminución en el porcentaje de DCs en el timo, disminución que es estadísticamente significativa en el caso de las cDC. Sin embargo al comparar estos valores con los porcentajes observados en el timo de ratones lúpicos observamos que los porcentajes son muy bajos, similares a los encontrados en el timo de ratones controles y prelúpicos. La Figura 25C muestra que la inyección de DCs, independiente de su origen, no induce la activación de las cDC y pDC en el timo de ratones prelúpicos como lo demuestra la evaluación de CD86, PD-L1 y MHC-II. Por otro lado observamos que el repertorio de LT en el timo de los ratones utilizados para la transferencia adoptiva es normal (Figura 26), indicando nuevamente que la inyección de DCs de ratones controles o lúpicos no inducen cambios en la homeostasis tímica.

En resumen, determinamos que las DCs cumplen un rol gatillante en el LES al inducir la producción de autoanticuerpos en ratones BWF1 previamente sanos. Observamos que estas participan directa o indirectamente en la activación y diferenciación de LB y LT del bazo además de autorregular la proliferación y activación de las DCs. En conjunto todos estos resultados demuestran que las

DCs de ratones lúpicos promueven el desarrollo de autoinmunidad en ratones BWF1, principalmente a nivel de la respuesta humoral por parte de los LB.

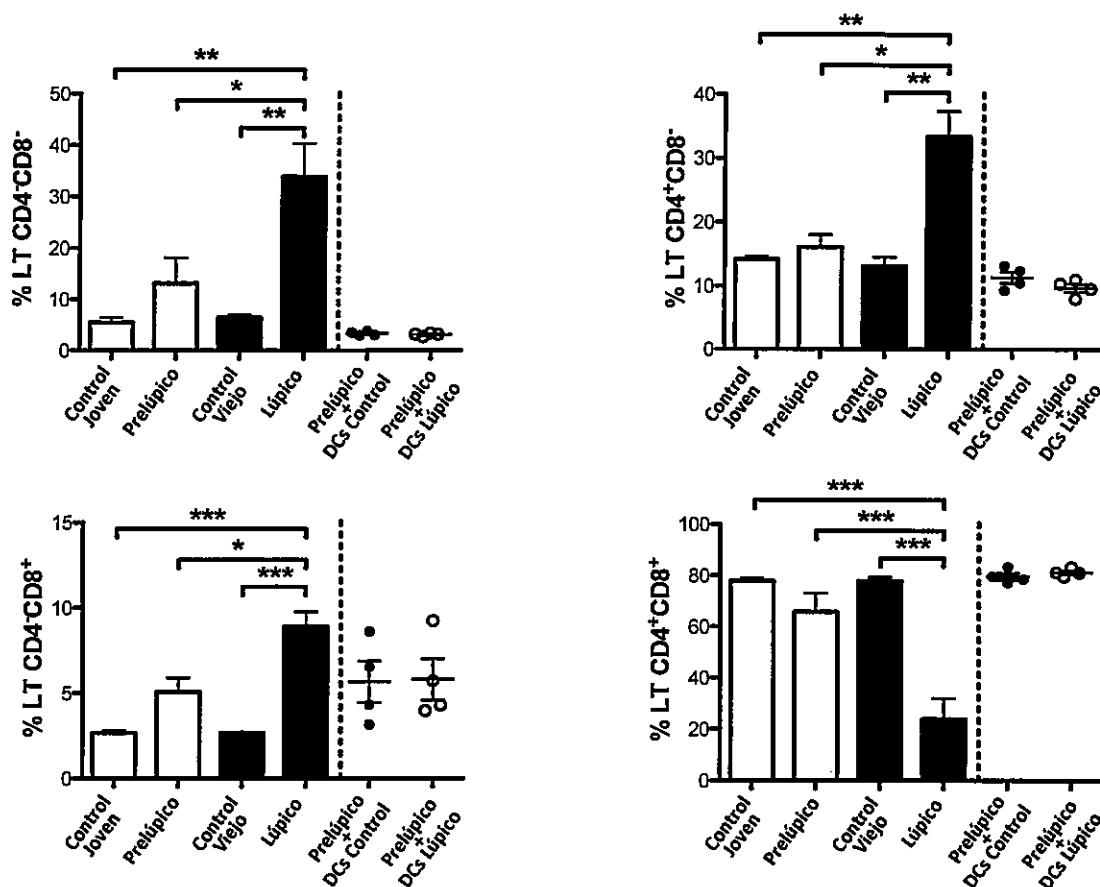
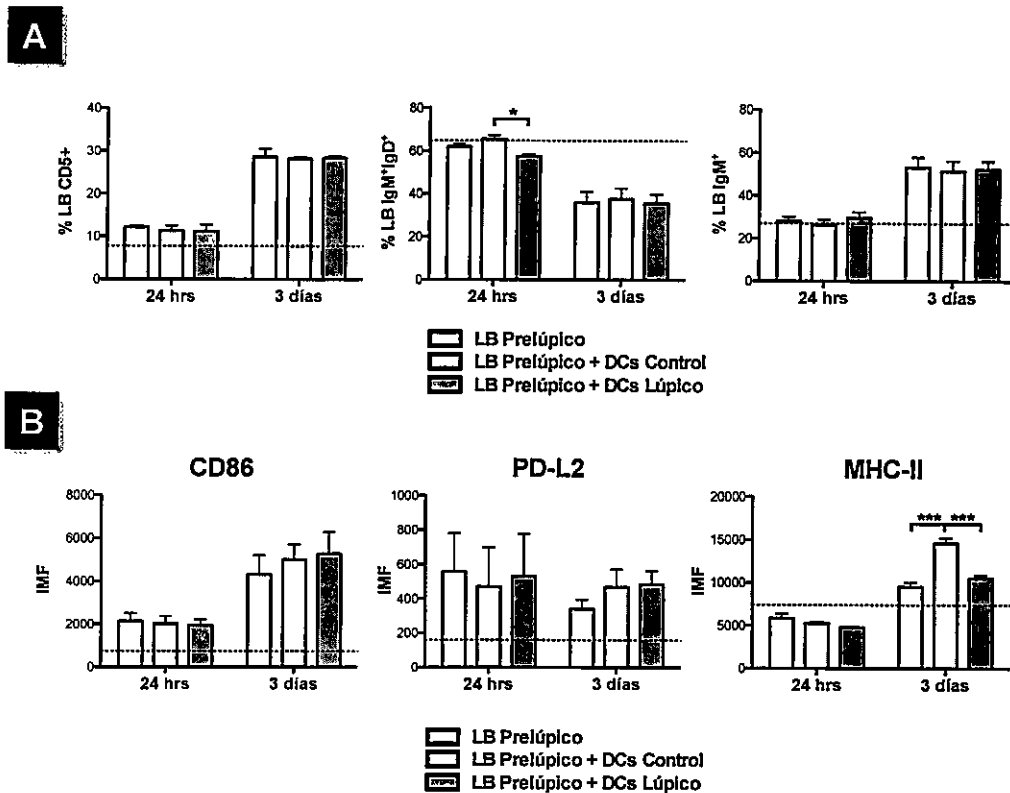


Figura 26. El timo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos presenta un repertorio normal de LT. Los porcentajes de LT se determinaron mediante citometría de flujo en donde se identificaron cuatro sub-poblaciones principales, LT CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN), LT CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, LT CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, y LT CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP). El análisis estadístico en los gráficos de puntos se realizó mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney (n=4 por grupo experimental). El análisis estadístico en los gráficos de barras se realizó mediante un test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Bonferroni. \*p<0.05, \*\*p<0.001.

#### 4.4. DCs del bazo de ratones lúpicos inducen la maduración de Linfocitos B *in vitro*

Se ha demostrado que las DCs modulan la función de los LB mediante factores solubles y de manera contacto dependiente (Ding, Cai, Marroquin, Ildstad, & Yan, 2009; Jorgensen y cols., 2010). Con el objetivo de determinar si la activación y diferenciación de LB observada *in vivo* requiere de la interacción directa con DCs, realizamos experimentos de co-cultivos entre LB de bazo de ratones prelúpicos con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. La Figura 27A muestra el análisis estadístico de los porcentajes de LB CD5<sup>+</sup>, LB vírgenes (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) y LB de memoria (IgM<sup>+</sup>) obtenidos luego de 24 horas o 3 días de co-cultivo en presencia de DCs de bazo de ratones controles o lúpicos (3 experimentos independientes). Observamos que la subpoblación de LB vírgenes disminuye a 24 hrs luego de la interacción con DCs de ratones lúpicos. Las sub-poblaciones de LB CD5<sup>+</sup> o LB IgM<sup>+</sup> no se vieron afectadas por la presencia de DCs de bazo de ratones controles o lúpicos, lo que sugiere que los cambios observados en estas sub-poblaciones *in vivo* tienen otra causa. La Figura 27B muestra el análisis estadístico de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de CD86, PD-L1 y MHC-II en LB de 3 experimentos independientes. No observamos cambios en el estado de activación de los LB en co-cultivo en cuanto a la expresión de CD86 y PD-L2. Sin embargo sí observamos una disminución en la expresión de MHC-II en los LB co-cultivados con DCs de ratones lúpicos, replicando así el fenómeno observado en los experimentos *in vivo*.



**Figura 27.** DCs del bazo de ratones lúpicos interactúan directamente con LB para gatillar la disminución de LB vírgenes y la baja expresión de MHC-II. **A)** Se determinaron los porcentajes de LB CD5<sup>+</sup> (B220<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>), LB vírgenes (CD19<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), LB IgM<sup>+</sup> (CD19<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo luego de cultivar LB prelúpicos durante 24 hrs o 3 días con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos. **B)** Análisis del estado de activación de LB (CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) de bazo de ratones prelúpicos cultivados con DCs de bazo de ratones controles o lúpicos durante 24 hrs o 3 días. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la IMF de los marcadores CD86, PD-L1 y MHC-II de 3 experimentos independientes. Las líneas punteadas en cada gráfico indican el porcentaje e IMF inicial previo al co-cultivo. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de 2 vías con post test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## 5. DISCUSIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multifactorial de etiología aun desconocida que se caracteriza principalmente por la presencia de auto-anticuerpos que forman complejos inmunes los cuales se depositan en los tejidos causando inflamación y daño tisular. La producción anormal de auto-anticuerpos es una consecuencia de la activación de linfocitos B (LB) auto-reactivos mediada principalmente por linfocitos T (LT). Por otro lado la activación de LT y la posterior generación de una respuesta inmune son procesos que requieren de la participación activa de células presentadoras de antígeno (APC), específicamente de las células dendríticas (DCs). Además de participar en la iniciación de una respuesta inmune adaptable, las DCs son mediadoras clave del fino balance entre inmunidad y tolerancia. En el presente trabajo se evaluó el rol de las DCs en el establecimiento de autoinmunidad en el lupus utilizando el modelo animal BWF1.

El rol de las DCs en la mantención de tolerancia ha sido evaluado eliminando esta población de manera constitutiva, lo que genera un quiebre en los mecanismos de tolerancia hacia antígenos propios generando autoinmunidad (Ohnmacht y col. 2009). Por el contrario, la incorporación de DCs cargadas con auto-antígenos en ratones sanos gatilla la pérdida de tolerancia a lo propio generándose síntomas del tipo autoinmune (Georgiev y col. 2005). Ambos experimentos demuestran que las DCs participan en la mantención de tolerancia, lo que las hace ser un blanco importante dentro del estudio de enfermedades autoinmunes como el lupus. Las DCs son una población de células muy heterogéneas (Steinman & Idoyaga 2010). Las células dendríticas convencionales

(cDC) y plasmocitoides (pDC) representan las dos principales sub-poblaciones de DCs. Ambas comparten algunas características como APCs sin embargo son morfológica, fenotípica y funcionalmente diferentes y estas diferencias podrían reflejarse en la patogénesis del LES. Por una parte las cDC presentan una mayor capacidad presentadora de antígeno y en el contexto del lupus las cDC tienen gran capacidad para capturar y procesar material apoptótico y necrótico rico en auto-antígenos (Fransen y col. 2010). Por otro lado, las pDC se activan luego de interactuar con complejos inmunes lo que gatilla en éstas una alta producción de IFN- $\alpha$ , citoquina que ha sido ampliamente vinculada con la iniciación y desarrollo de esta enfermedad (Blanco y col. 2001; Lövgren y col. 2004; Denny y col. 2007; Rönnblom & Pascual 2008; Obermoser & Pascual 2010; Mathian y col. 2011; Hagberg y col. 2011; Ivashkiv & Donlin 2014). Diversos estudios han documentado anormalidades en cuanto al fenotipo, funcionalidad y homeostasis de las cDC y pDC durante el lupus murino (Colonna y cols. 2006; Jorgensen y cols. 2010; Gleisner y cols. 2013) y humano (Zwo y col. 2004; D. Ding y col. 2006; Jin y col. 2010).

En este trabajo corroboramos resultados anteriores donde se había observado que ratones de la cepa BWF1, luego de presentar síntomas de la enfermedad, presentan un incremento en los porcentajes y números absolutos de cDC y pDC en el bazo en comparación al bazo de ratones controles y prelúpicos (Figura 2 y Gleisner y col. 2013). Debido a las diferencias funcionales entre cDC y pDC es importante considerar el efecto individual del incremento de cada subpoblación en la patogénesis del lupus. Bajo este contexto es que surge la necesidad de realizar una mejor caracterización de las sub-poblaciones de DCs, en especial énfasis sobre las pDC, dado que éstas mostraron el mayor aumento tanto en porcentaje



como en número absoluto en comparación a las cDC. En este trabajo demostramos que las pDC se encuentran aumentadas, tanto en porcentaje como número absoluto, en el bazo de ratones lúpicos y corresponden a pDC caracterizadas por el fenotipo  $CD11c^+B220^+CCR9^+PDCA-1^{-}SiglecH^{-}CD9^+$  (Figura 3). La baja expresión del receptor de quimioquinas CCR9 en las pDC de bazo de ratones lúpicos sugiere que las pDC podrían presentar problemas de reclutamiento al intestino, bajo condiciones de inflamación (Wendland y col. 2007). Por otro lado se ha determinado que tanto progenitores hematopoiéticos como pDC requieren de la expresión conjunta de CCR7 y CCR9 para migrar al timo (Krueger y col. 2010; Zlotoff y col. 2010; Hadeiba y col. 2012). Se ha propuesto que la migración de las pDC al timo ocurre gracias a la expresión de CCR9, participando así en la generación de tolerancia central (Hadeiba y col. 2012). A su vez, diversos estudios han propuesto que la expresión de CCR9 define a pDC tolerogénicas, capaces de inducir la diferenciación de LTreg y suprimir la respuesta inmune (Hadeiba y col. 2008; Drakes y col. 2009). En resumen podemos inferir que la pérdida de expresión de CCR9 en pDC de bazo de ratones lúpicos podría explicar en parte la pérdida de tolerancia tanto central como periférica. Por otro lado y a favor de nuestra hipótesis, aquellas pDC que carecen del receptor CCR9 corresponden a pDC en un mayor estado de activación caracterizado por la alta expresión de moléculas co-estimuladoras (Figura 4), una alta secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Drakes y cols. 2009) y una gran capacidad de inducir la proliferación de LT vírgenes (Drakes y col. 2009). Por otro lado, y quizás de mayor interés es el trabajo de Engleman y col. donde se demuestra que las células dendríticas capaces de producir IFN- $\alpha$  corresponden a una subpoblación de pDC caracterizadas fenotípicamente por el marcador CD9 y la falta de los marcadores PDCA-1, CCR9 y

SiglecH (Björck y col. 2011). En dicho trabajo también se demuestra que esta subpoblación de pDC se origina a partir de pDC CCR9<sup>+</sup>PDCA-1<sup>+</sup>SiglecH<sup>+</sup>CD9<sup>-</sup> lo que nos permite inferir que durante el desarrollo del lupus esta subpoblación de pDC, que sí se encuentra en el bazo de ratones prelúpicos, se activa y madura, lo que hace que estas pierdan la expresión del receptor CCR9 (Drakes y col. 2009) y comiencen a producir altos niveles de IFN- $\alpha$ . A su vez, su elevado estado de activación, caracterizado por la sobre-expresión de MHC-II y de las moléculas de coestimulación CD86 y PD-L1 (Figura 4), favorecerían la presentación antigénica hacia LT vírgenes auto-reactivos. A favor de todos estos resultados, se ha descrito que el tratamiento simultaneo con anticuerpos bloqueadores para CD80 y CD86 antes de la aparición de los síntomas del lupus mejora significativamente la sobrevida y la gravedad de la enfermedad en modelos murinos de esta enfermedad (Nakajima y col. 1995; Kinoshita y col. 2000). Resultados similares se obtienen al tratar a pacientes con lupus con anticuerpos bloqueadores contra IFN- $\alpha$  (Yoo 2010). Por otro lado distintos estudios han propuesto que células dendríticas B220<sup>+</sup>CCR9<sup>-</sup> corresponderían a precursores de células dendríticas convencionales dado que carecen de los clásicos marcadores de pDC como PDCA-1 y SiglecH (Segura y col. 2009; Schlitzer y col. 2011; Schlitzer y col. 2012). Dichos estudios revelan la posibilidad de que las pDC caracterizadas en el bazo de ratones lúpicos sean las responsables del aumento de las cDC encontradas en el mismo órgano. Ambas hipótesis no son excluyentes dado a que se podría tratar de la misma subpoblación de células dendríticas que sea capaz de efectuar ambos procesos.

La acumulación de DCs encontrada en el bazo de ratones lúpicos sugiere la existencia de un desequilibrio en la homeostasis que podría ser explicado en función de cambios en las capacidades de migración, sobrevida o quimioatracción

de las DCs bajo un contexto de autoinmunidad. En concordancia con estudios previos (Drakes y col. 2009), los ensayos de inducción de apoptosis realizados en este trabajo sugieren que las pDC CCR9<sup>+</sup> poseen intrínsecamente mayor resistencia a la muerte celular programada en comparación a otras sub-poblaciones de DCs (Figura 5). Dado que esta subpoblación en particular es la que se encuentra aumentada en el bazo de ratones lúpicos podemos inferir que su mayor capacidad de sobrevivida permite que éstas se acumulen en dicho órgano. Por otro lado, Wan y col. demostraron que la citoquina IL-21, que se encuentra en altos niveles en pacientes con lupus (Ohl & Tenbrock 2011), induce la apoptosis específica de cDC, efecto que es revertido por la citoquina GM-CSF (Wan y col. 2013), que también se encuentra elevada en pacientes con lupus (de Zubiria Salgado y col. 2012). Dicho trabajo sugiere que el microambiente del bazo podría estar modulando la sobrevivida y acumulación de las DCs.

Al evaluar la capacidad migratoria de las DCs nuestros resultados indican que las DCs de ratones lúpicos poseen características distintivas que le permiten migrar y acumularse en distintos órganos linfoides (Figura 6). Observamos que la migración de las DCs de ratones lúpicos fue preferencialmente al bazo, órgano donde se detectó la mayor cantidad de eventos positivos (Figura 6B), demostrándose así la presencia de mecanismos quimioattractantes hacia este órgano en particular. En concordancia con ello, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que células estromales y DCs de bazo de ratones lúpicos presentan un perfil de quimioquinas y receptores de quimioquinas alterado en comparación a ratones controles (Gleisner y col. 2013). El conjunto de estos resultados, más los antecedentes previos de nuestro laboratorio, sugieren que el microambiente del bazo más las características fenotípicas y funcionales

aberrantes de las DCs permitiría que éstas se localicen preferencialmente en el bazo donde serían capaces de interactuar con otros linfocitos y así montar una respuesta inmune anormal característica del lupus.

La habilidad de las DCs de iniciar y mediar respuestas inmunes es consecuencia de su localización tisular y su capacidad especial de migración (Randolph y col. 2008). La migración alterada de DCs son un sello característico de enfermedades inflamatorias (Randolph y col. 2008). El tráfico de linfocitos y de APC al timo es una característica de modelos de inflamación o autoinmunidad murino (Ishikawa y col. 2001; Ito y col. 2004; S Ishikawa & Matsushima 2007; Sprent & Surh 2009; Hale & Fink 2009; Edelmann & Marconi 2011; Hodge y col. 2012). En concordancia con esto, demostramos que el timo de ratones con lupus presenta altos porcentajes de DCs en comparación a ratones controles y prelúpicos (Figura 7). Dicha expansión se debe al aumento conjunto de cDC y pDC, sin embargo las cDC muestran un incremento mayor en el timo (Figura 8). Mediante la caracterización fenotípica de las DCs tímicas determinamos que tanto cDC como pDC del timo de ratones lúpicos provienen de la periferia (Figuras 9, 10 y 11). Cabe destacar que la baja expresión de CCR9 en pDC de ratones lúpicos no fue un impedimento para migrar hacia el timo. En concordancia con esto, Hadeiba y col. proponen que además de CCR9 se requiere de la expresión de CCR7 para lograr la localización correcta de pDC hacia el timo, por lo que habría que evaluar la expresión de dicho receptor en DCs de ratones lúpicos. Por otro lado se ha determinado que la involución tímica, proceso que se gatilla con la edad pero que se encuentra exacerbado en el lupus, produce una ruptura de la estructura medular del timo lo que provoca una acumulación de DCs en la médula en vez de la corteza

tímica (McCaughy y col. 2008) perturbando así el proceso de selección negativa (Takeoka y col. 1995; Xia y col. 2012). El daño estructural generado en el timo durante la involución tímica aumentaría la permeabilidad de éste permitiendo la entrada de distintas poblaciones de LT y LB que en estados normales no son capaces de ingresar (Hodge y col. 2012). Es probable que el daño tisular del timo en ratones con lupus cambie los requerimientos de ingreso al timo (Hadeiba y col. 2012). Relacionado con el daño tisular del timo de ratones lúpicos, nuestros resultados indican que la baja celularidad es debido en su mayoría por la pérdida casi completa de linfocitos T  $CD4^+CD8^+$  (Figura 13), resultados que ya habían sido reportado por otros autores (Ishikawa y col. 2001). Por otra parte nuestros resultados muestran que las cDC y pDC del timo de ratones lúpicos presentan un estado de hiperactivación en comparación a ratones controles y prelúpicos (Figura 12). En la literatura se ha informado que las DCs migratorias al ingresar al timo maduran y sobre-expresan moléculas de co-estimulación como CD86 (Li y col. 2009), fenómeno que estaría exacerbado en el caso de ratones lúpicos.

Las DCs en el timo cumplen un rol en la mantención de la tolerancia central al participar en los procesos de selección negativa y generación de LTreg (Goldschneider & Cone 2003; Bonasio y col. 2006; Proietto, Dommelen, y col. 2008; Guerri y col. 2013). Para demostrar la contribución de las DCs tímicas de ratones lúpicos en la mantención o pérdida de tolerancia central se realizaron experimentos de co-cultivo entre timocitos de ratones controles con DCs tímicas de ratones controles o lúpicos. Nuestros resultados indican que DCs tímicas de ratones lúpicos tienen una mayor capacidad de generar o expandir la población de LTreg a partir de timocitos controles en comparación a DCs tímicas de ratones controles (Figura 16). Wu y col. demostraron que cDC migratorias, identificadas como  $CD11b^+Sirp\alpha^+$ ,

tienen mayor capacidad de inducir Treg *in vitro* en comparación a cDC de origen intratímico ( $CD8^+CD11b^-Sirp\alpha^+$ ) (Proietto y col. 2008), lo cual podría explicar en parte el aumento de LTreg en los ensayos *in vitro* utilizando DCs de timo de ratones lúpicos. A su vez la presencia de DCs anormales en el timo de ratones con lupus puede dar lugar a la selección positiva de LT auto-reactivos en vez de una selección negativa normal. Esta posibilidad es respaldada por el hecho que existe un claro aumento de LT  $CD4^+$  en el timo de ratones enfermos mientras que la población de LT  $CD4^+CD8^+$  (DP) se encuentra drásticamente disminuida (Figura 13) (Takeoka y col. 1995; Ishikawa y col. 2001). Nuestros experimentos de co-cultivos confirman que las DCs del timo de ratones lúpicos participan directamente en la disminución de la población de LT DP (Figura 15), con lo que se emula el fenómeno observado *in vivo* (Figura 13). En conjunto dichos resultados sugieren que el aumento de Treg (Figura 14 y Abe y col. 2008), de LT  $CD4^+$  y la pérdida de LT DP en el timo de los ratones lúpicos sería un efecto directo del aumento de cDC  $Sirp\alpha^+$  en dicho órgano durante el desarrollo del lupus.

El rol *in vivo* de las DCs en la pérdida de la tolerancia observada durante el desarrollo del LES ha sido investigado por varios autores, sin embargo aun no se logra determinar a cabalidad las funciones no redundantes de las DCs durante esta enfermedad. Originalmente caracterizadas como potentes células presentadoras de antígeno a LT vírgenes, las DCs también participan en la mantención de la tolerancia inmunológica. El estado de activación/maduración en que se encuentren las DCs, además de su localización tisular, el tipo de sub-poblaciones de DCs y otros factores son responsables de determinar si las DCs previenen o inician la activación de una respuesta inmune (Hardin 2005). Por una

parte, la inyección de DCs cargadas con antígenos provenientes de células apoptóticas en ratones sanos, sin predisposición a desarrollar lupus, induce en estos últimos la pérdida de tolerancia evidenciado por un aumento de auto-anticuerpos en el suero (Georgiev y col. 2005). Sin embargo los autores indican que son necesarios otros factores de susceptibilidad para lograr inducir autoinmunidad a largo plazo que desemboque en la expresión clínica de la enfermedad (Georgiev y col. 2005). En este contexto nuestros resultados indican que la inyección de DCs de ratones lúpicos en ratones sanos induce la pérdida de tolerancia, evidenciado por el aumento en los niveles séricos de auto-anticuerpos contra ADNdh (Figura 18). Similar a lo observado por Georgiev y col. no detectamos daño renal a pesar del alto nivel sérico de auto-anticuerpos en los ratones tratados con DCs de ratones lúpicos (Georgiev y col. 2005). De acuerdo con esto, un aumento en los niveles de auto-anticuerpos anti ADNdh son un sello característico del LES, mientras que la presencia de auto-anticuerpos anti-Sm (proteína asociada al ARN) se relaciona directamente con la nefritis (Bagavant & Fu 2009). Este punto no fue ensayado en nuestro modelo experimental. A pesar de no producir daño renal, detectamos otras manifestaciones clínicas de la enfermedad en los ratones BWF1 inyectados con DCs de ratones lúpicos, como son cambios en el patrón de citoquinas en el suero (Figura 21) y desregulación de poblaciones linfoides en distintos órganos, fenómenos que no fueron detectados al inyectar DCs de ratones control. Dichos resultados indican claramente un rol protagónico de las DCs de ratones lúpicos superior al posible efecto del fondo genético con susceptibilidad al lupus utilizado en nuestro modelo experimental. La inyección de DCs de ratones lúpicos indujo en ratones prelúpicos un aumento de las poblaciones de LB CD5<sup>+</sup>, DCs totales y células pre-plasmáticas en sangre periférica

(Figura 20). El aumento de DCs en la sangre de ratones lúpicos de la cepa BWF1 es un fenómeno que había sido detectado con anterioridad en nuestro laboratorio (Gleisner y col. 2013). El aumento de DCs y distintas sub-poblaciones de LB fue detectado en el bazo de ratones prelúpicos 2 meses después de las inyecciones de DCs de ratones lúpicos. El aumento de DCs en sangre y bazo de ratones BWF1 tratados con DCs de ratones lúpicos sugiere que dicho aumento proviene de regulaciones gatilladas por las mismas DCs. Distintos estudios han determinado que varias citoquinas se encuentran involucradas en la generación y maduración de las DCs. Entre éstas la principal sería el factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) seguido por TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-2, IL-6, IL-7, IL-13, IL-15 entre otros (Zou & Tam 2002). En concordancia con esto encontramos elevados niveles de IL-6 en el suero de los ratones inyectados con DCs de ratones lúpicos (Figura 21), lo cual podría explicar en parte la expansión de DCs en estos ratones. Por otro lado se ha determinado que IFN de tipo I actuaría como un importante regulador de la apoptosis, proliferación y migración de DCs (Mattei y col. 2009). Tomando en consideración que en el caso de las DCs de ratones lúpicos las pDC que fueron inyectadas serían del fenotipo IFN- $\alpha$ <sup>+</sup> (Björck y col. 2011) podemos inferir que estas secretan esta citoquina aumentando así la proliferación de las DCs endógenas. Por otro lado el aumento de LB CD5<sup>+</sup> en bazo y sangre de ratones BWF1 inyectados con DCs de ratones lúpicos es un fenómeno que se observó en ratones BWF1 enfermos (Figuras 24 y 27 y Sho Ishikawa & Matsushima 2007) y también en pacientes con LES (Böhm 2004) y se correlaciona directamente con el aumento de auto-anticuerpos en el suero. LB que expresan en su superficie la glicoproteína de membrana CD5 han sido relacionados con enfermedades autoinmunes debido a su capacidad de producir anticuerpos naturales polireactivos, que reconocen



auto-antígenos con baja afinidad, y que bajo un contexto de autoinmunidad se transforman en auto-anticuerpos patogénicos de alta afinidad (Tobón y col. 2013). Una de las características de una subpoblación de LB CD5<sup>+</sup> llamados B10, es su capacidad de producir IL-10 (Yanaba y col. 2008), citoquina que se encontró en altos niveles en el suero de ratones tratados con DCs de ratones lúpicos (Figura 21). En concordancia con esto, tratamientos utilizando anticuerpos bloqueadores de IL-10 han demostrado retrasar la enfermedad en ratones BWF1 (Ishida y col. 1994). Por otro lado el aumento en el porcentaje de células pre-plasmáticas en la sangre de ratones tratados con DCs de ratones lúpicos sugiere que estos ratones están generando una respuesta humoral. La inyección de DCs de ratones lúpicos también indujo un aumento de LB IgM<sup>+</sup> en desmedro de la población de LB vírgenes (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) en el bazo de ratones prelúpicos (Figura 27). A pesar de no ser un fenómeno observable en ratones lúpicos, se ha documentado que pacientes con LES presentan una baja frecuencia de LB IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> en la sangre (Rodríguez-Bayona y col. 2010) y un aumento de LB IgM<sup>+</sup> de memoria (Jacobi y col. 2008). Al analizar el estado de activación de los LB totales en el bazo de ratones inyectados con DCs de ratones lúpicos observamos que estos expresan elevados niveles de las moléculas CD86 y PD-L2, un estado de hiperactivación que no fue detectado en LB de bazo de ratones lúpicos pero que ha sido documentado en LB de pacientes con lupus (Grammer & Lipsky 2003). Por otra parte la baja expresión de MHC-II en LB de bazo de ratones prelúpicos inyectados con DCs de ratones lúpicos es un fenómeno que se observa en LB de bazo de ratones lúpicos y también en LB de pacientes con lupus (Lugar y col. 2012). La baja expresión de MHC-II en LB ha sido previamente descrito como una característica de células plasmáticas maduras (Wilkinson y col. 2012). En conjunto estos resultados sugieren que las DCs

provenientes de un contexto de autoinmunidad son capaces, de manera directa o indirecta, de activar a LB, inducir la diferenciación a LB CD5<sup>+</sup>, B10 y células plasmáticas, gatillando así la producción de auto-anticuerpos característica de una respuesta humoral. Experimentos de co-cultivos de DCs y LB nos permitieron demostrar que la baja frecuencia de LB vírgenes y la disminución de la expresión de MHC-II son fenómenos dependientes directamente de la interacción entre LB y DCs provenientes de ratones lúpicos (Figura 27). En concordancia con esto, varios estudios han identificado la participación directa de las DCs sobre la activación y maduración de LB. Específicamente se sabe que las DCs modulan el crecimiento celular y diferenciación de LB a células plasmáticas (Dubois y col. 1999; Wykes & Macpherson 2000; Jego y col. 2003; Poeck y col. 2004; Cerutti y col. 2005; Nair y col. 2009) y en un contexto de autoinmunidad se han visto directamente involucradas en la estimulación de LB (Wan y col. 2008; Ding y col. 2009).

Por otro lado la inyección de DCs también afectó la respuesta inmune mediada por LT. Nuestros resultados muestran un aumento de los LT CD3<sup>+</sup> totales del bazo de ratones BWF1 inyectados con DCs de ratones lúpicos, aumento que fue debido a la expansión conjunta de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> (Figura 24). El aumento de LT en el bazo no fue un fenómeno observado con anterioridad en ratones lúpicos, sin embargo si ha sido documentado en otros modelos murinos del lupus y se ha determinado que su aumento es la principal causal de esplenomegalia en estos ratones (Teichmann y col. 2010). Dentro de las sub-poblaciones de LT observamos un claro aumento de los LT CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ , o Th1, en el bazo de ratones BWF1 inyectados con DCs de ratones lúpicos, fenómeno que también se observó en ratones lúpicos y que ha sido reportado en pacientes con lupus (Dean y col. 2000). En concordancia con dicho aumento también observamos elevados

niveles de IL-12 en el suero de estos ratones (Figura 21), citoquina necesaria para la diferenciación hacia Th1 y que ha sido demostrada ser producida específicamente por pDC CD9<sup>+</sup> (Björck y cols. 2011). Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado que la interacción directa entre DCs de ratones lúpicos con LT vírgenes de ratones controles induce en estos últimos un fenotipo Th1, en comparación a la utilización de DCs de ratones controles (Gleisner 2013). Dicho antecedente nos permite inferir que las DCs de ratones lúpicos son capaces de interactuar directamente in vivo con LT vírgenes en el bazo de ratones prelúpicos, induciendo su diferenciación hacia LT Th1.

Por último al analizar las distintas poblaciones linfocitarias en el timo observamos que no hubo mayores diferencias entre aquellos ratones inyectados con DCs de ratones lúpicos o controles. Por un lado, dado que los ratones receptores eran ratones jóvenes éstos no presentaban timos con daño tisular o involución haciendo que este órgano pudiera cumplir sus funciones normalmente impidiendo así el ingreso de DCs patogénicas. Otra posible explicación es que dado que la involución tímica es un proceso que ocurre durante el envejecimiento las DCs podrían participar dentro de este proceso sólo en ratones de mayor edad. Esto nos permite proponer que los defectos tímicos observados durante el desarrollo del LES son una suma conjunta tanto de la edad de los individuos como de las deficiencias funcionales linfocitarias que se gatillan durante la enfermedad.

Utilizando una aproximación experimental opuesta, la delección constitutiva de DCs en ratones con predisposición al lupus (modelo murino MRL.Fas<sup>lpr</sup>) permitió determinar que las DCs participan en la inducción de la enfermedad más que en su regulación (Teichmann y col. 2010). Dicha aproximación experimental demostró que la falta de DCs en ratones MRL.Fas<sup>lpr</sup> inhibe la formación de auto-anticuerpos

del tipo IgM e IgG, disminuye la cantidad de células plasmáticas, inhibe la expansión de LT y disminuye la diferenciación de éstos hacia Th1 (Teichmann y col. 2010). Todos estos resultados fueron corroborados mediante la transferencia adoptiva de DCs provenientes de un contexto de autoinmunidad a ratones BWF1 sanos, dando así mayor validez a los resultados obtenidos durante este trabajo. Dado que la aproximación experimental de Teichmann y col. elimina del todo a todas aquellas células que expresen la integrina CD11c surge la interrogante si alguno de los fenómenos observados por ellos se deba a la falta de otra población que exprese dicha proteína. De esta manera la transferencia adoptiva de DCs en un modelo murino del lupus nos permite corroborar y verificar dichos resultados, además de permitirnos evaluar el efecto de estas células sobre la población endógena de DCs en los ratones BWF1.

En resumen observamos que las DCs participan principalmente promoviendo una respuesta humoral y en segundo grado una respuesta dependiente de LT durante el desarrollo del lupus, permitiendo esclarecer su rol protagónico en la iniciación de esta enfermedad autoinmune.

## 6. RESUMEN DE RESULTADOS

- Ratones lúpicos presentan un aumento de las DCs en el bazo, principalmente de la población pDC caracterizada como CCR9<sup>-</sup> PDCA-1<sup>-</sup> Siglech<sup>-</sup> CD9<sup>+</sup>, la cual posee un alto estado de activación y sería aquella responsable de secretar IFN- $\alpha$ . A su vez observamos que durante el desarrollo del lupus las DCs aumentan su migración hacia los órganos linfoides acumulándose en éstos probablemente debido a una mayor resistencia a la apoptosis, a cambios en la expresión de receptores de quimioquinas y al microambiente estromal.
- Durante el desarrollo del lupus cDC y pDC de la periferia aumentan su migración hacia el timo donde, debido a cambios fenotípicos y funcionales pierden su capacidad de regular la proliferación de LTreg permitiendo su expansión en desmedro de la pérdida de LT DP alterando así la homeostasis tímica.
- Las DCs cumplen un rol gatillante en el LES al inducir la producción de autoanticuerpos en ratones BWF1 previamente sanos. Observamos que estas participan directa e indirectamente en la activación y diferenciación de LB y LT además de autorregular la proliferación y activación de las DCs. En conjunto todos estos resultados demuestran que las DCs de ratones lúpicos promueven el desarrollo de autoinmunidad en ratones BWF1, principalmente a nivel de la respuesta humoral por parte de los LB.

## 7. CONCLUSIÓN

En conjunto, nuestros resultados indican que durante el desarrollo del lupus existe un tráfico aberrante de las células dendríticas (DCs) hacia distintos órganos promoviendo así la pérdida de la homeostasis celular e induciendo autoinmunidad de manera sistémica. La acumulación de las DCs en los órganos linfoides, en particular en el bazo, en conjunto con su estado de hiperactivación les permitiría inducir la activación tanto de LT como LB gatillando así una respuesta humoral exacerbada caracterizada por la producción de altos niveles de auto-anticuerpos. Por otro lado su migración desregulada hacia el timo, órgano encargado de mantener la tolerancia central del organismo, estaría involucrada con la pérdida de mecanismos de selección negativa y el aumento anormal de LTreg, aumento que puede ser considerado como un mecanismo compensatorio del organismo en su búsqueda de restablecer la tolerancia. Finalmente concluimos que las DCs son protagonistas claves en la iniciación, desarrollo y mantención del LES.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S., 2010. *Cellular and Molecular Immunology* 6th ed., Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
- Abe, J. y col., 2008. Increased Foxp3(+) CD4(+) regulatory T cells with intact suppressive activity but altered cellular localization in murine lupus. *The American journal of pathology*, 173(6), pp.1682–92.
- Bagavant, H. & Fu, S.M., 2009. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*, 21(5), pp.489–94.
- Birnberg, T. y col., 2008. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity*, 29(6), pp.986–97.
- Björck, P., Leong, H.X. & Engleman, E.G., 2011. Plasmacytoid Dendritic Cell Dichotomy: Identification of IFN-  $\alpha$  Producing Cells as a Phenotypically and Functionally Distinct Subset. *The Journal of Immunology*, 186, pp.1477–1485.
- Blanco, P. y col., 2001. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Science*, 294, pp.1540–1543.
- Böhm, I., 2004. Increased peripheral blood B-cells expressing the CD5 molecules in association to autoantibodies in patients with lupus erythematosus and evidence to selectively down-modulate them. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, pp.338–343.
- Bonasio, R. y col., 2006. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nature immunology*, 7(10), pp.1092–100.
- Bonelli, M., Smolen, J.S. & Scheinecker, C., 2010. Treg and lupus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(Suppl 1), pp.i65–i66.
- Carreño, L.J. y col., 2009. Disease activity in systemic lupus erythematosus is associated with an altered expression of low-affinity Fc  $\gamma$  receptors and costimulatory molecules on dendritic cells. *Immunology*, 128, pp.334–341.
- Carroll, M.C., 2004. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Immunology*, 4(October), pp.825–831.
- La Cava, A., 2009. Lupus and T Cells. *Lupus*, 18, pp.196–201.
- Cerutti, A., Qiao, X. & He, B., 2005. Plasmacytoid dendritic cells and the regulation of immunoglobulin heavy chain class switching. *Immunology and Cell Biology*, 83, pp.554–562.

- Chan, B.O.T.M. y col., 1999. A Novel Mouse with B Cells but Lacking Serum Antibody Reveals an Antibody-independent Role for B Cells in Murine Lupus. *Journal of Experimental Medicine*, 189(10), pp.1639–1647.
- Colonna, L. y col., 2006. Abnormal costimulatory phenotype and function of dendritic cells before and after the onset of severe murine lupus. *Arthritis Research & Therapy*, 8(2), pp.1–11.
- Crispín, J.C. y col., 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in Molecular Medicine*, 16(2), pp.47–57.
- Dean, G.S. y col., 2000. Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59, pp.243–251.
- Decker, P. y col., 2006. Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 45(9), pp.1087–1095.
- Denny, M.F. y col., 2007. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood*, 110(8), pp.2907–15.
- Ding, C. y col., 2009. Plasmacytoid dendritic cells regulate autoreactive B cell activation via soluble factors and in a cell-to-cell contact manner. *Journal of Immunology*, 183(11), pp.7140–9.
- Ding, D. y col., 2006. Aberrant Phenotype and Function of Myeloid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, 177, pp.5878–5889.
- Ding, D. y col., 2006. Aberrant Phenotype and Function of Myeloid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, 177(9), pp.5878–5889.
- Drakes, M.L., Stiff, P.J. & Blanchard, T.G., 2009. Inverse relationship between dendritic cell CCR9 expression and maturation state. *Immunology*, 127(4), pp.466–76.
- Dubois, B. y col., 1999. Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, 66, pp.224–230.
- Edelmann, S.L. & Marconi, P., 2011. Peripheral T Cells Re-Enter the Thymus and Interfere with Central Tolerance Induction. *The Journal of Immunology*, 11, pp.1–8.
- Fransen, J.H. y col., 2010. The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 12(207), pp.1–8.
- Georgiev, M. y col., 2005. Mature dendritic cells readily break tolerance in normal mice but do not lead to disease expression. *Arthritis and Rheumatism*, 52(1), pp.225–238.



- Gioud, M. y col., 1983. In Vivo and In Vitro Production of Anti-Histone Antibodies in NZB/NZW Mice. *The Journal of Immunology*, 131(1), pp.269–274.
- Gleisner, M.A. y col., 2013. Dendritic and stromal cells from the spleen of lupic mice present phenotypic and functional abnormalities. *Molecular Immunology*, 54(3-4), pp.423–34.
- Gleisner, M.A., 2013. *Papel de las células dendríticas en el desarrollo del lupus*. Universidad de Chile.
- Goldschneider, I. & Cone, R.E., 2003. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. *Trends in Immunology*, 24, pp.77–81.
- Grammer, A.C. & Lipsky, P.E., 2003. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 5 Suppl 4, pp.S22–7.
- Gubbels, M.R. y col., 2014. Effects of MHC and Gender on Lupus-Like Autoimmunity in Nba2 Congenic Mice. *The Journal of Immunology*, 175, pp.6190–6196.
- Guerri, L. y col., 2013. Analysis of APC Types Involved in CD4 Tolerance and Regulatory T Cell Generation Using Reaggregated Thymic Organ Cultures. *The Journal of Immunology*, 190, pp.2102–2110.
- Hadeiba, H. y col., 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nature immunology*, 9(11), pp.1253–60.
- Hadeiba, H. y col., 2012. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*, 36(3), pp.438–450.
- Hadeiba, H. & Butcher, E.C., 2013. Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *European Journal of Immunology*, (10), pp.1–12.
- Hagberg, N. y col., 2011. IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1 $\beta$  and LFA-1. *Journal of immunology*, 186(9), pp.5085–94.
- Hale, J.S. & Fink, P.J., 2009. Back to the Thymus: Peripheral T Cells Come Home. *Immunology Cell Biology*, 87(1), pp.58–64.
- Hanabuchi, S. y col., 2010. Thymic Stromal Lymphopoietin-Activated Plasmacytoid Dendritic Cells Induce the Generation of FOXP3+ Regulatory T Cells in Human Thymus. *Journal of immunology*, 184(6), pp.2999–3007.
- Hardin, J. a, 2005. Dendritic cells: potential triggers of autoimmunity and targets for therapy. *Annals of the rheumatic diseases*, 64 Suppl 4, pp.iv86–90.

- Hodge, D.L. y col., 2012. MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes. *European Journal of Immunology*, 42(10), pp.2644–2654.
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A. & Jameson, S.C., 2005. Central Tolerance: Learning Self-Control in the Thymus. *Nature Reviews Immunology*, 5, pp.772–782.
- Hopp, A.-K., Rupp, A. & Lukacs-Kornek, V., 2014. Self-Antigen Presentation by Dendritic Cells in Autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 5(55), pp.1–14.
- Horwitz, D. a, 2008. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Research & Therapy*, 10(6), pp.1–9.
- Hu, Z. y col., 2011. Berberine Induces Dendritic Cell Apoptosis and Has Therapeutic Potential for Rheumatoid Arthritis. , 63(4), pp.949–959.
- likuni, N. y col., 2009. Cutting edge: Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology*, 183(3), pp.1518–22.
- Ioannou, M. y col., 2013. In vivo ablation of plasmacytoid dendritic cells inhibits autoimmunity through expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Immunology*, 190(6), pp.2631–40.
- Ishida, H. y col., 1994. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *The Journal of experimental medicine*, 179(1), pp.305–10.
- Ishikawa, B.S. y col., 2001. Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(12), pp.1393–1402.
- Ishikawa, S. y col., 2002. Increased circulating CD11b + CD11c + dendritic cells ( DC ) in aged BWF1 mice which can be matured by TNF-alpha into BLC / CXCL13-producing DC . *European Journal of Immunology*, 32(7), pp.1881–1887.
- Ishikawa, S. & Matsushima, K., 2007. Aberrant B1 cell trafficking in a murine model for lupus. *Frontiers in Bioscience*, 12, pp.1790–1803.
- Ishikawa, S. & Matsushima, K., 2007. Aberrant B1 cell trafficking in a murine model for lupus. *Frontiers in Bioscience*, pp.1790–1803.
- Ito, T. y col., 2004. Defective B1 cell homing to the peritoneal cavity and preferential recruitment of B1 cells in the target organs in a murine model for systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology*, 172(6), pp.3628–34.

- Ivashkiv, L.B. & Donlin, L.T., 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nature Publishing Group*, 14(1), pp.36–49.
- Iwata, Y. y col., 2009. Dendritic cells contribute to autoimmune kidney injury in MRL-Faslpr mice. *Journal of Rheumatology*, 36(2), pp.306–3014.
- Jacobi, A.M. y col., 2008. Activated Memory B Cell Subsets Correlate With Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 58(6), pp.1762–1773.
- Jego, G. y col., 2003. Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity*, 19, pp.225–234.
- Jin, O. y col., 2010. Abnormalities in circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 12(4), p.R137.
- Jorgensen, T.N. y col., 2010. Development of Murine Lupus Involves the Combined Genetic Contribution of the SLAM and Fc gamma R Intervals within the Nba2 Autoimmune Susceptibility Locus. *The Journal of Immunology*, 184, pp.775–786.
- Kalled, S.L., Cutler, a H. & Burkly, L.C., 2001. Apoptosis and altered dendritic cell homeostasis in lupus nephritis are limited by anti-CD154 treatment. *Journal of Immunology*, 167(3), pp.1740–7.
- Kamath, A.T. y col., 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood*, 100(5), pp.1734–41.
- Kinoshita, K. y col., 2000. Costimulation by B7-1 and B7-2 is required for autoimmune disease in MRL-Faslpr mice. *Journal of Immunology*, 164, pp.6046–6056.
- Klein, L. y col., 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature Reviews Immunology*, 9(12), pp.833–844.
- Krueger, A. y col., 2010. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood*, 115(10), pp.1906–12.
- Kyewski, B. & Klein, L., 2006. A Central Role for Central Tolerance. *Annu. Rev. Immunol.*, 24, pp.571–606.
- Li, J. y col., 2009. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), pp.607–22.
- Lövgren, T. y col., 2004. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis and rheumatism*, 50(6), pp.1861–72.

- Lugar, P.L. y col., 2012. Molecular characterization of circulating plasma cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *PloS one*, 7(9), pp.1–15.
- Marks, S.D. & Tullus, K., 2012. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Pediatric Nephrology*, 27, pp.1855–1868.
- Martín-Gayo, E. y col., 2010. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood*, 115(26), pp.5366–75.
- Mathian, A. y col., 2011. Interferon- $\alpha$  induces unabated production of short-lived plasma cells in pre-autoimmune lupus-prone (NZB $\times$ NZW)F1 mice but not in BALB/c mice. *European Journal of Immunology*, 41(3), pp.863–872.
- Matta, B.M., Castellaneta, A. & Thomson, A.W., 2010. Tolerogenic plasmacytoid DC. *European Journal of Immunology*, 40, pp.2667–2676.
- Mattei, F. y col., 2009. Type I IFN regulate DC turnover in vivo. *European Journal of Immunology*, 39, pp.1807–1818.
- McCaughy, T.M. y col., 2008. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(11), pp.2575–2584.
- Merad, M. y col., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*, 31, pp.563–604.
- Moulton, V.R. & Tsokos, G.C., 2011. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 13(2), p.207.
- Nair, J.R. y col., 2009. Direct interaction with dendritic cells through CD28- CD80 / CD86 supports plasma cell survival. *The Journal of Immunology*, 182(1001), pp.34–39.
- Nakajima, A. y col., 1995. Preferential dependence of autoantibody production in murine lupus on CD86 costimulatory molecule. *European Journal of Immunology*, 25, pp.3060–3069.
- Naparstekt, Y. & Plotz, P.H., 1993. The Role of Autoantibodies in Autoimmune Disease. *Annual Review of Immunology*, 11, pp.79–104.
- Obermoser, G. & Pascual, V., 2010. The interferon- $\alpha$  signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 19, pp.1012–1019.
- Ohl, K. & Tenbrock, K., 2011. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, pp.1–21.

- Ohnmacht, C. y col., 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), pp.549–59.
- Okamoto, A. y col., 2011. Regulatory T-cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, pp.1–9.
- Pathak, S. & Mohan, C., 2011. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. *Arthritis research & therapy*, 13(5), pp.241–250.
- Perry, D. y col., 2011. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, p.271694.
- Poeck, H. y col., 2004. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Immunobiology*, 103(8), pp.3058–3064.
- Proietto, A.I. y col., 2008. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *PNAS*, 105(50), pp.19869–19874.
- Proietto, A.I., van Dommelen, S. & Wu, L., 2009. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunology and cell biology*, 87(1), pp.39–45.
- Rahman, A. & Isenberg, D. a, 2008. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 358(9), pp.929–39.
- Randolph, G.J., Ochando, J. & Partida-Sánchez, S., 2008. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annual Review of Immunology*, 26, pp.293–316.
- Reyes, P., 2011. *Papel del microambiente linfóide en el desarrollo del Lupus Eritematoso Sistémico*. Universidad Andres Bello.
- Rioux, J.D. & Abbas, A.K., 2005. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature Insight Review*, 435, pp.584–589.
- Rodríguez-Bayona, B. y col., 2010. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Research & Therapy*, 12, pp.1–10.
- Rönnblom, L. & Pascual, V., 2008. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus*, 17, pp.394–399.
- Schlitzer, A. y col., 2011. Identification of CCR9- murine plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs. *Blood*, 117(24), pp.6562–70.

- Schlitzer, A. y col., 2012. Tissue-specific differentiation of a circulating CCR9- pDC-like common dendritic cell precursor. *Blood*, 119(25), pp.6063–71.
- Segura, E., Wong, J. & Villadangos, J. a, 2009. Cutting edge: B220+CCR9- dendritic cells are not plasmacytoid dendritic cells but are precursors of conventional dendritic cells. *Journal of Immunology*, 183(3), pp.1514–7.
- Seitz, H.M. & Matsushima, G.K., 2010. Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *International Review Immunology*, 29(2), pp.1–21.
- Shlomchik, M.J. y col., 1994. The Role of B Cells in lpr/lpr-induced Autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*, 180, pp.1295–1306.
- Sprent, J. & Kishimoto, H., 2001. The thymus and central tolerance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 356, pp.609–616.
- Sprent, J. & Surh, C.D., 2009. Re-entry of mature T cells to the thymus: an epiphenomenon? *Immunology and Cell Biology*, 87, pp.46–49.
- Steinman, R.M. & Idoyaga, J., 2010. Features of the dendritic cell lineage. *Immunological reviews*, 234(1), pp.5–17.
- Takeoka, Y. y col., 1995. Thymic microenvironmental abnormalities in MRL/MP-lpr/lpr, BXSB/MpJ Yaa and C3H HeJ-gld/gld mice. *Journal of autoimmunity*, 8(2), pp.145–61.
- Teichmann, L.L. y col., 2010. Dendritic cells in lupus are not required for activation of T and B cells but promote their expansion, resulting in tissue damage. *Immunity*, 33(6), pp.967–78.
- Tobón, G.J., Izquierdo, J.H. & Cañas, C. a, 2013. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Diseases*, 2013, pp.1–17.
- Urra, J.M. & Torre, M.D. La, 2012. Cytokines and Systemic Lupus Erythematosus. In H. Almoallim, ed. *Systemic Lupus Erythematosus*. InTech.
- Wan, C.-K. y col., 2013. The cytokines IL-21 and GM-CSF have opposing regulatory roles in the apoptosis of conventional dendritic cells. *Immunity*, 38(3), pp.514–27.
- Wan, S. y col., 2008. Direct B cell stimulation by dendritic cells in a mouse model of lupus. *Arthritis and rheumatism*, 58(6), pp.1741–50.
- Watanabe, N. y col., 2005. Hassall ' s corpuscles instruct dendritic cells to human thymus. *Nature Letters*, 436, pp.1181–1185.

- Wendland, M. y col., 2007. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), pp.6347–52.
- Wentworth, J. & Davies, C., 2009. Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews*, 8, pp.103–104.
- Wilkinson, S.T. y col., 2012. Partial plasma cell differentiation as a mechanism of lost major histocompatibility complex class II expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 119(6), pp.1459–67.
- Wykes, M. y col., 1998. Dendritic Cells Interact Directly with Naive B Lymphocytes to Transfer Antigen and Initiate Class Switching in a Primary T-Dependent Response. *The Journal of Immunology*, 161, pp.1313–1319.
- Wykes, M. & Macpherson, G., 2000. Dendritic cell  $\pm$  B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals. *Immunology*, 100, pp.1–3.
- Xia, J. y col., 2012. Age-Related Disruption of Steady-State Thymic Medulla Provokes Autoimmune Phenotype via Perturbing Negative Selection. *Aging and disease*, 3(3), pp.248–259.
- Yanaba, K. y col., 2008. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 223, pp.284–299.
- Yoo, D.H., 2010. Anticytokine therapy in systemic lupus erythematosus D-H. *Lupus*, 19, pp.1460–1467.
- Zhu, J. y col., 2005. T cell hyperactivity in lupus as a consequence of hyperstimulatory antigen-presenting cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(7), pp.1869–1878.
- Zlotoff, D. a y col., 2010. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood*, 115(10), pp.1897–905.
- Zou, G.M. & Tam, Y.K., 2002. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *European Cytokine Network*, 13(2), pp.186–199.
- De Zubiria Salgado, A., Herrera-Diaz, C. & Salgado, A.D.Z., 2012. Lupus nephritis: an overview of recent findings. *Autoimmune diseases*, 2012, pp.1–21.
- Zwo, B. y col., 2004. Phenotypic and functional deficiencies of monocyte-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *International immunology*, 16(11), pp.1595–604.