

UCH-FC  
Biología  
C 198  
C ↓



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Pregrado



## **“USO DEL FLUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE COMO FUENTE ANTIGÉNICA PARA LA CARGA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

# **JAVIER IGNACIO CAMPOS ACUÑA**

Director del Seminario de Título:  
Juan Carlos Aguillón Gutiérrez

Co-Director del Seminario de Título:  
Diego Catalán Martina

Patrocinante del Seminario de Título:  
María Rosa Bono Merino

Enero, 2015  
Santiago – Chile

**ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE**



**INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Javier Ignacio Campos Acuña:

**“USO DEL FLUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE  
COMO FUENTE ANTIGÉNICA PARA LA CARGA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS  
TOLEROGÉNICAS”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Dr. Juan Carlos Aguillón Guitérrez  
**Director Seminario de Título**

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dr. Diego Catalán Martina  
**Co-director de Seminario de Título**

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dra. María Rosa Bono Merino  
**Patrocinante Seminario de Título**

Firma manuscrita en verde sobre una línea horizontal.

**Comisión de Evaluación**

Dr. Eliás UtrerasPuratich  
**Presidente Comisión**



Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Christian González Billault  
**Evaluador**

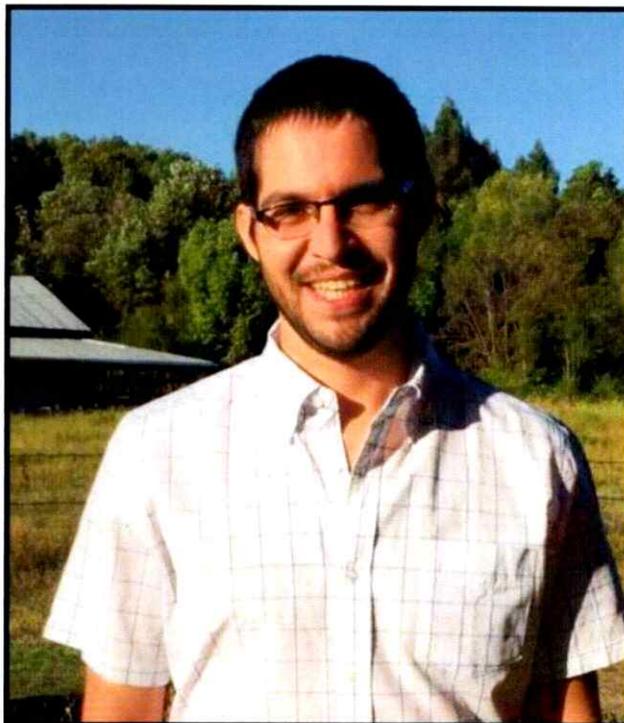
Firma manuscrita en verde sobre una línea horizontal.

Santiago, Enero de 2015

*A mi novia y compañera, Loreto  
A mis amigos y al de arriba, Arturo  
A mis viejos, Carlos y Laura  
Sin ustedes esto no habría sido posible.*

## BIOGRAFÍA

Nací un 23 de Mayo de 1988 en Santiago, como primer hijo y nieto de la familia de mis dos padres, Carlos y Laura, quienes cimentaron los valores de la persona que soy actualmente. Tuve el agrado de compartir mi infancia con dos hermanos y muchos amigos del barrio, quienes me enseñaron el valor de la amistad y compañerismo.



Mi paso por el colegio fue bastante bueno en lo académico, siempre manteniendo buenas notas, a pesar de ser un poco flojo para el estudio. Fue durante la enseñanza media, cuando me di cuenta que mi futuro iba a estar ligado a la ciencia. En un principio la química era una de mis pasiones, pero a medida que avanzaba el tiempo fui adquiriendo un particular gusto por la biología y mi curiosidad siempre me guió para querer seguir aprendiendo sobre las distintas características y complicaciones de la naturaleza. A pesar de los conocimientos adquiridos en el colegio, los que enrielarían mi vida en cuanto a lo académico, lo que más me marcó de esta bella etapa no fue precisamente la parte intelectual, sino las amistades que logré forjar y que han probado ser

duraderas, ya que después de más de 10 años los que estuvieron conmigo aún se mantienen aquí. Decidí entrar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología molecular con el fin de aplicar mis conocimientos a favor del desarrollo de mi país y creo firmemente que el cierre de esta etapa me dará las herramientas necesarias para cumplir con ese sueño.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Juan Carlos Aguillón y al Dr. Diego Catalán por la oportunidad que me dieron de hacer la tesis bajo su tutela. Esta instancia me dio la oportunidad de aprender como nunca antes sobre el quehacer científico y desafiarme a niveles donde no había tenido que hacerlo previamente.

Le agradezco al IRTGroup, en particular a Jaxaira y Perry, con quienes tuve la oportunidad de compartir esta experiencia de principio a fin, por su amistad y buena onda. A Lorena, Rodrigo, Paulina y Bárbara por su constante apoyo en los primeros pasos como un científico de verdad. A Álex, Asunción, Caro, Gaby, Andrea, Eli, Pauli, Jorge, Katina, Vero y Pía por su buena disposición y la alegría que le dieron al laboratorio. Como olvidar a la Sra. Nancy, con su cariño, bromas y ánimo para trabajar para que no nos faltara nada (excepto mi PBS).

Agradezco a Roberto, Matías y Norberto, del IBT. Sus conocimientos y experiencia guiaron mi trabajo después de un mar de preguntas. Además sin ustedes, los momentos vividos no habrían sido ni la mitad de lo entretenidos de lo que fueron. A muchos otros integrantes del PDI, como Caro Hernández, Maca, Juanita, Garota, Bastián, Soso, Leo, Karina Kramm por hacer que mi estadía en el laboratorio fuera muy grata.

Al grupo de trabajo que me acogió luego de que terminara los experimentos de mi tesis, a Karina, que sin duda fue un apoyo importantísimo en mi formación en mis primeros pasos como profesional. A Mauro, Tania, Pancho y Edgar, por la amistad entregada durante este último año y por enseñarme a trabajar en un área en la que me esperaban muchas sorpresas.

Agradecimientos especiales a mis compañeros en la U por todos los buenos momentos vividos, los carretes (que no fueron muchos), y esas tardes de trabajos en los que nos dedicábamos a procrastinar en vez de trabajar.

A mis amigos de la vida, Negro, Mamón, Topo, Yayo, Suspy, Pelao, Oski, y por sobre todo a Arturo por todos esos buenos momentos, conversaciones importantes sobre la vida y política cuando se nos pasa un poco la mano. Por la eterna compañía en los buenos y malos momentos desde que nos conocimos y nos convertimos en WC. Por aguantarme y apoyarme en momentos en los que a no me he portado de lo mejor y seguir queriéndome con mis pifias y virtudes.

Agradecer de todo corazón a mi polola, Loreto. Por ser el pilar fundamental de mis emociones, por estar ahí cuando parecía que todo se iba a derrumbar y por sacarme adelante en cada momento de flaqueza. Sin ti, estos 6 años de carrera habrían sido muy distintos, pero tu empuje y tu cariño me dieron la fuerza para continuar.

Finalmente, agradecer a mi familia. Mis hermanos Daniel y Carlos, mis papás Carlos y Laura y a mi tía Rita, por su paciencia e infinito amor que me han entregado durante toda mi vida. Gracias a ustedes me he convertido en el hombre que soy hoy en día, tuve la oportunidad de estudiar y tener un ambiente grato en mi casa que me permitió desarrollarme en el ámbito emocional y académico sin ningún problema. Este trabajo es para ustedes, espero hacerlos sentirse orgullosos.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Enfermedades Autoinmunes e Inflamatorias perteneciente al grupo de "Inmunorregulación y Tolerancia" (IRTGroup) del programa de inmunología, ubicado en el instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Su realización fue posible con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1100102 y del instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia P09/016F.

# ÍNDICE

BIOGRAFÍA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	vi
FINANCIAMIENTO .....	ix
ÍNDICE.....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiv
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 Artritis Reumatoide .....	3
3.2 Células Dendríticas .....	6
3.4 Diferenciación Linfocitaria.....	10
3.4 Antígenos en Artritis Reumatoide.....	14
4. HIPÓTESIS .....	17
5. OBJETIVOS .....	18
5.1. Objetivo General.....	18
5.2. Objetivos específicos .....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
6.1. Obtención de fracciones proteicas enriquecidas en autoantígenos prevalentes desde fluido sinovial de pacientes con AR .....	19
6.2. Análisis electroforético de las fracciones de fluido sinovial .....	20
6.3. Obtención de PBMC, monocitos y linfocitos T CD4+ de pacientes con AR y controles sanos.....	21
6.4. Cultivo celular y ensayos de proliferación mediante reacción mixta leucocitaria .....	25
6.5. Citometría de flujo.....	27
6.6 Análisis Estadístico.....	28
7. RESULTADOS .....	29

7.1. El fluido sinovial de pacientes con AR presenta altos niveles de albúmina y un perfil proteico característico .....	29
.....	34
7.2. Respuesta proliferativa de PBMC a fluido sinovial de pacientes con AR o con OA. ....	35
7.3. Respuesta proliferativa de linfocitos T CD4+ en respuesta a fracciones proteicas de fluido sinovial de pacientes con AR.....	37
8. DISCUSIÓN.....	47
8.1 Separación proteica del fluido sinovial.....	48
8.2 Respuesta proliferativa de PBMC en respuesta a la estimulación con fluido sinovial .....	50
8.3 Maduración de células dendríticas con MPLA y capacidad de procesamiento antigénico. ....	52
8.4 Respuesta antígeno-específica a proteínas de presentes en el fluido sinovial de pacientes con AR .....	54
8.5 Proyecciones .....	59
9. CONCLUSIONES .....	61
10. REFERENCIAS.....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Subtipos de linfocitos T CD4+. ....13

**Tabla 2:** Áreas bajo la curva en el análisis para el análisis de remoción de albúmina ..31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Sinápsis Inmunológica. ....	8
<b>Figura 2</b> Diferenciación de monocitos a células dendríticas (DCs) maduras y reacción leucocitaria mixta.....	233
<b>Figura 3</b> Remoción de albúmina de fluido sinovial de pacientes con AR a través de cromatografía de afinidad. ....	30
<b>Figura 4</b> Separación proteica del fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) mediante cromatografía de intercambio aniónico.....	¡Error! Marcador no definido.
<b>Figura 5</b> Análisis electroforético de las fracciones obtenidas mediante intercambio aniónico del FS AR08:.....	344
<b>Figura 6</b> Respuesta proliferativa de PBMC de pacientes con artritis reumatoide (AR) y donantes sanos a estimulación con fluido sinovial de pacientes con AR o con osteoartritis (OA).. ....	366
<b>Figura 7</b> Perfil fenotípico de células dendríticas (DCs) maduras con monofosforil lípido A (MPLA). ....	39
<b>Figura 8.</b> Respuesta linfocitaria basal.. ....	41
<b>Figura 9.</b> Respuesta antígeno específica de linfocitos T CD4+ de pacientes con AR a fracciones de FS obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico.....	43
<b>Figura 10.</b> Producción de IL17 por parte de linfocitos T CD4+ de pacientes con AR en respuesta a la estimulación con fracciones de FS obtenido a través de cromatografía de intercambio aniónico. ....	45
<b>Figura 11</b> La respuesta de los linfocitos T CD4+ productores de interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) de pacientes con artritis reumatoide (AR) es antígeno específica y la estimulación antigénica con fracciones antigénicas de fluido sinovial de pacientes AR no influencia la viabilidad celular. ....	46
<b>Figura 12</b> Plasticidad celular de linfocitos T CD4+.....	577

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>7-AAD</b>	7-aminoactinomicina.
<b>ACPA</b>	Anti-citrullinated Peptide Antibody.
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza.
<b>AR</b>	Artritis Reumatoide.
<b>CD</b>	Cluster de Diferenciación.
<b>CFSE</b>	Carboxifluoresceina Succimidil Éster.
<b>CPA</b>	Células Presentadoras de Antígeno.
<b>DCs</b>	Células Dendríticas.
<b>FACS</b>	Fluorescence-Activated Cell Sorting.
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate.
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid Chromatography.
<b>FS</b>	Fluido Sinovial.
<b>FSC</b>	Forward Scatter.
<b>GM-SCF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
<b>HLA</b>	Human Leucocyte Antigen.
<b>iDCs</b>	Células Dendríticas inmaduras.
<b>IFN</b>	Interferón.
<b>Igs</b>	Inmunoglobulinas.
<b>IL</b>	Interleuquina.
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido.
<b>mDCs</b>	Células Dendríticas Maduras.
<b>MFI</b>	Intensidad de Fluorescencia Media Geométrica.

<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
<b>MPLA</b>	Monofosforil Lípido A.
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear Kappa B.
<b>OA</b>	Osteoartritis.
<b>PAGE</b>	Electroforésis en geles de poliacrilamida.
<b>PBMC</b>	Células Mononucleares de Sangre Periférica.
<b>PBS</b>	Tampón Fosfato Salino.
<b>PE</b>	Phycoerythrin.
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristato 14-acetato.
<b>PPD</b>	Derivado Proteico Purificado de Tuberculina.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>SBF</b>	Suero Bovino Fetal.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato Sódico
<b>SSC</b>	Side Scatter.
<b>TCR</b>	Receptor de linfocito T.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante Beta.
<b>Th</b>	Linfocito T helper.
<b>TLR</b>	Receptor del Tipo "Toll".
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral.
<b>tolDCs</b>	Células Dendríticas Tolerogénicas.
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador.

## 1. RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígenos (CPA) y conectan la respuesta inmune innata y adaptativa. Tienen la capacidad de inducir inmunidad o tolerancia a antígenos que fueron capturados desde el ambiente, procesarlos y presentarlos a linfocitos T, los que median posteriormente el desarrollo de la respuesta inmune.

Durante las enfermedades autoinmunes y específicamente en la artritis reumatoide (AR), las DCs captan antígenos del organismo y los presentan a linfocitos T CD4+ en un contexto inflamatorio. Previamente se ha descrito autoantígenos capaces de producir este tipo de respuestas, como el colágeno tipo 2, la vimentina y péptidos citrulinados del fibrinógeno, entre otros. Sin embargo, no se conoce en detalle qué antígeno en particular es necesario para el inicio de la respuesta autoinmune y para su mantención *in vivo*.

En el presente trabajo se separaron fracciones de fluido sinovial (FS) extraído de pacientes con AR mediante cromatografía de intercambio aniónico y se evaluó su idoneidad como fuente de autoantígenos para la carga de DCs maduras con monofosforil lípido A (MPLA), a partir de monocitos de sangre periférica de pacientes con AR. Se observaron fracciones de FS ricas en inmunoglobulinas (Igs) capaces de inducir una respuesta funcional en linfocitos T CD4+, lo que se observa como un incremento en la producción de IFN- $\gamma$ , IL-17 y proliferación celular, cuando éstos son co-cultivados autológamente con DCs estimuladas con dichas fracciones. Estos resultados sugieren que las inmunoglobulinas (Igs) pueden ser un antígeno promisorio para la carga de DCs tolerogénicas para el tratamiento de AR.

## 2. ABSTRACT

Dendritic cells are antigen-presenting cells that have the role of linking adaptive and innate immune responses. They have the ability to induce tolerance or immunity to antigens that were previously captured from the environment, processed and presented to CD4+ T lymphocytes, which then control the development of the adaptive immune response.

During autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis (AR), DCs capture antigens from the organism and present them to auto-reactive T lymphocytes in an inflammatory context. Several auto-antigens that produce this kind of response have been previously described like type 2 collagen, vimentin and citrullinated peptides from fibrinogen, amongst others. However, the antigen that triggers the immune response or the perpetuation of the disease has not been fully described.

In this work, synovial fluid (FS) obtained from inflamed joints from AR patients was separated using anionic exchange chromatographic approach and was tested as a source of auto-antigens to load DCs generated *ex vivo* from peripheral blood-monocytes and matured with monophosphoryl lipid-A (MPLA) from patients with AR. The results showed that there are various fractions of FS that are enriched in immunoglobulin (Ig) able to induce a functional response on T CD4+ lymphocytes and it was observed like an increased production of IFN-g and IL-17 and cellular proliferation when they were cultivated with autologous MPLA-DCs pulsed with said fractions. These results suggest that Ig might be a promissory auto-antigen for the loading of tolDCs as a possible cell therapy for the treatment of AR.

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1 Artritis Reumatoide

La AR es una enfermedad autoinmune asociada a incapacidad progresiva, complicaciones sistémicas y muerte temprana que afecta a aproximadamente el 1% de la población mundial y tiene altos costos socioeconómicos (Firestein, 2003). Aunque la causa de la enfermedad es desconocida, se cree que ésta es multifactorial e involucra factores genéticos, ambientales y azarosos. Grandes avances se han realizado para encontrar una cura para la enfermedad, sin embargo, las terapias actuales tienen un elevado costo y no logran hacer que los pacientes entren a un estado de remisión sintomática constante, la cual es alcanzada parcialmente en algunos casos con una administración farmacológica prolongada en el tiempo, por lo cual su tratamiento sigue siendo un desafío. Asimismo, se trata de una patología que inhabilita a los pacientes, con tasas de mortalidad que son más elevadas que en individuos sanos, debido a que la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares y otras complicaciones son más altas.

La AR está caracterizada principalmente por la inflamación de las articulaciones y la infiltración de células del sistema inmune, auto-reactivas hacia antígenos de la cavidad sinovial del enfermo, la destrucción del cartílago y hueso articular y otros desórdenes sistémicos. El diagnóstico actual se relaciona con la presencia de altos niveles de anticuerpos anti péptidos citrulinados (ACPA) y de factor reumatoideo, un anticuerpo capaz de reconocer inmunoglobulina G en el suero del paciente. Aunque el primero tiene alta sensibilidad diagnóstica, no todos los pacientes poseen altos niveles de éste, mientras el segundo no es exclusivo para la AR (Aletaha y col., 2010).

Estudios en gemelos han demostrado que existe una gran concordancia de la enfermedad, la que alcanza hasta un 30% en gemelos del tipo monocigótico y tan solo un 5% en gemelos dicigóticos (MacGregor y *col.*, 2000). Por otro lado, análisis genómicos han demostrado que genes codificantes para proteínas participantes en el sistema inmune están estrechamente correlacionados con la enfermedad. Entre estos casos, uno de los más reconocidos y estudiados es el locus del antígeno leucocitario humano (HLA) DRB1, en el cual se ha demostrado la existencia de alelos que codifican un motivo conservado de aminoácidos (QKRAA), al cual se le dio el nombre del epítipo compartido, y que confieren una particular susceptibilidad a sus portadores para contraer AR (Gregersen y *col.*, 1987). Este hecho, sumado a la participación de células presentadoras de antígenos (CPA) y de linfocitos T específicos con una mayor afinidad por péptidos afines al epítipo compartido en la articulación (Klareskog y *col.*, 1982), sugieren que la selección de un subtipo de linfocitos T en particular, la afinidad por ciertos péptidos y una presentación más efectiva de éstos, tienen un rol importante en el desbalance de la inmunidad adaptativa observada en la patogenia de las enfermedades autoinmunes y en particular de la AR. Por otro lado, desbalances en la regulación de la señalización de células inmunes a través de factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B y polimorfismos en proteínas de activación funcional de linfocitos T CD4+, como CTLA-4 y PTPN22, se han relacionado también con la enfermedad, por ejemplo, y se cree que son factores muy importantes para su desarrollo (Begovich y *col.*, 2004).

Avances en genómica, aplicada al estudio de distintas enfermedades, han permitido la identificación y relevancia de cada uno de estos factores, lo que da cuenta de la contribución en conjunto de pequeñas variables para dar comienzo a la patología.

Sin embargo, las bajas probabilidades de estos contribuyentes los hace pobres marcadores para el diagnóstico.

Existen factores ambientales de riesgo que otorgan susceptibilidad a contraer AR. Entre ellos, el más importante es el tabaquismo (Symmons y col., 1997). Diversos estudios centrados en estudiar descriptivamente la asociación entre tabaquismo y AR, dieron cuenta de posibles mecanismos moleculares en la aparición de la enfermedad ACPA positiva, y además, concluyeron que este factor no era preponderante en la aparición de la enfermedad en los pacientes que no presentaban este tipo de anticuerpos (Padyukov y col., 2004). Además, se observó que el desarrollo de la AR en fumadores ocurría principalmente en pacientes con polimorfismos en el HLA-DR (Lee y col., 2007). Debido a estos hallazgos, se propuso un modelo que daba cuenta de la importancia de una modificación post-traducciona l en proteínas para el desarrollo de la enfermedad ACPA positiva, en donde el reemplazo de arginina por citrulina, en un proceso mediado por la enzima peptidil-arginin deiminasa (PAD), en el caso de individuos fumadores, se veía exacerbada en el pulmón (Löfdahl y col., 2006). Cuando el pulmón entra en contacto con el humo u otras sustancias inflamatorias se produce una activación de macrófagos que secretarían altos niveles de PAD. Esto produciría citrulinación de proteínas (Makrygiannakis y col., 2008), las cuales serían capturadas por CPA y presentadas en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con gran eficiencia, debido a la afinidad aumentada entre este tipo de péptidos y el epítipo compartido (Hill y col., 2003). Esto llevaría a la activación de las células T y B, lo que eventualmente desencadenaría la formación de complejos inmunes en la cavidad sinovial de las articulaciones de pacientes, luego que este presente el fenómeno de citrulinación no específica (Makrygiannakis y col., 2006). Esta evidencia

sugiere que la carga y el tipo de antígenos presentados por las moléculas MHC de las CPA tienen un papel fundamental en el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes.

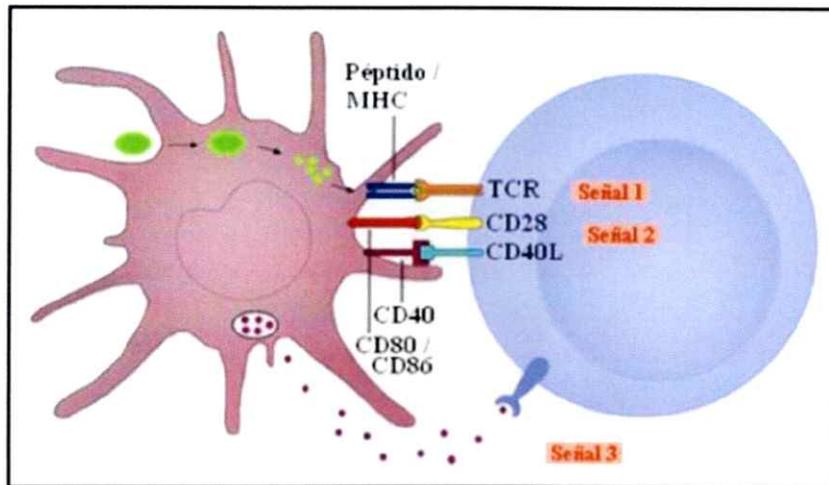
### **3.2 Células Dendríticas**

Las células dendríticas (DCs) son CPA capaces de presentar señales potencialmente nocivas a los linfocitos T CD4+. Se dice que son el nexo entre la respuesta inmune innata y adaptativa y son las encargadas de regular la fuerza, calidad y el tipo de respuesta inmune (Merad y *col.*, 2012, Ueno y *col.*, 2007).

Las DCs pueden ser clasificadas según su linaje: plasmocitoides o mieloides. Las DCs plasmocitoides se caracterizan por secretar altas cantidades de interferón (IFN) de tipo I, citoquina relacionada con la eliminación de patógenos virales debido a la característica de esta molécula. Por otro lado, las de origen mieloides presentan alta expresión de los receptores de tipo "Toll" (TLR) y maduran rápidamente al encontrarse con alguna de estas señales activadoras, lo que produce su migración hacia los linfonodos más cercanos (Ziegler-Heitbrock y *col.*, 2010). Este subtipo celular también presenta altos niveles de la integrina CD11c en su superficie y son las más abundantes en los órganos linfoides secundarios (Asselin-Paturel y *col.*, 2005, Reizis y *col.*, 2010).

En su estado inmaduro, las DCs se ubican en sectores que generalmente están expuestos a patógenos, como lo son la piel o mucosas del organismo. Es ahí donde reconocen señales patogénicas o del sistema inmune innato, que ha sido previamente expuesto a microbios y luego decodifican la información para entregarla a células del sistema inmune adaptativo (Pulendran y *col.*, 2001). Para que esto ocurra, es imperante que las DCs sufran un proceso de maduración, el cual ocurre tras el

reconocimiento de antígenos patogénicos a través de TLRs en su superficie o dominios de oligomerización nucleotídica (NOD), capaces de reconocer patógenos intracelulares (Iwasaki and Medzhitov, 2004, Steinman y *col.*, 2002). Durante este proceso aumentan su motilidad hacia linfonodos secundarios, estructuras especializadas en el desarrollo de respuestas inmunes y en el que ocurre la presentación antigénica (Trombetta and Mellman, 2005), aumentan su expresión del receptor CCR7, el cual tiene como ligando la quimioquina CCL19, la cual otorga motilidad hacia los linfonodos (Tang and Cyster, 1999), la expresión de moléculas co-activadoras como CD40 (Caux y *col.*, 1994), co-estimuladoras como CD80 y CD86 y su secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 e IL-23, entre otras (Heufler y *col.*, 1996). Por otro lado, las células aumentan su tamaño, emiten largas prolongaciones citoplasmáticas y disminuyen su capacidad de captura y procesamiento antigénico. Cuando las DCs maduras alcanzan el linfonodo, presentan el antígeno capturado a linfocitos T vírgenes induciéndoles un fenotipo efector (Trombetta and Mellman, 2005, van Vliet y *col.*, 2007). Para que las DCs sean capaces de comunicar señales a los linfocitos T CD4+ y que en éstos se produzca una activación, deben existir tres tipos de señales (Gisbergen, 2005): i) la presentación de un antígeno unido al MHC y el reconocimiento de este complejo por el receptor antigénico de linfocitos T (TCR); ii) la interacción entre moléculas de co-estimulación de las DCs con moléculas de superficie en el linfocito T, y iii) la señalización, a través de citoquinas secretadas por las DCs, en el linfocito T CD4+. En la Figura 1 se observa un esquema de la sinapsis inmunológica, proceso en el cual toman contacto las DCs y los linfocitos T, y que es mediado por interacciones de las moléculas indicadas previamente y en donde se gatillan diversas señales intracelulares.



**Figura 1 Sinapsis Inmunológica:** La activación de los linfocitos T CD4+ por parte de las células presentadoras de antígenos (CPAs) requiere de 3 señales. La primera señal es el reconocimiento antigénico a través de la interacción MHC/péptido-TCR. La segunda señal es la interacción entre moléculas co-estimuladoras y la tercera señal es la generada a través de citoquinas secretadas por la CPA.

### 3.3 Células Dendríticas y Tolerancia

Además de orquestar respuestas agresivas e inflamatorias contra potenciales patógenos, las DCs están encargadas de coordinar los procesos de tolerancia central y periférica en el organismo. La tolerancia central es el evento que educa a los linfocitos T en el momento de su génesis para reaccionar de una manera controlada en contra de señales del mismo organismo y ocurre en el timo. En este proceso, las DCs y otras CPAs de la médula tímica presentan un repertorio extenso de péptidos que se encuentran naturalmente en el cuerpo a pre-linfocitos T, los cuales son seleccionados según su afinidad por el complejo MHC-péptido (Apostolou y *col.*, 2002). Por otro lado, en la tolerancia periférica, las DCs captan y procesan antígenos en la periferia, que no son reconocidos como peligrosos y los transportan a los linfonodos secundarios, donde producen inducen una hipo-respuesta en aquellos linfocitos reactivos a estos antígenos, o bien, direccionan la diferenciación de linfocitos T vírgenes a un perfil regulador (Chen y *col.*, 2003), capaces de secretar IL-10. Este proceso está en parte determinado por el balance de citoquinas que producen las DCs, en el que la cantidad de citoquinas anti-inflamatorias supera con creces la cantidad de citoquinas pro-inflamatorias. Es de esta manera, que las DCs que reconocen péptidos no inmunogénicos secretan mayores niveles de TGF- $\beta$  e IL-10 y menores niveles de IL-4, IL-6, IL-12 e IL-23, que su contraparte madura. Por otro lado, los niveles de expresión de moléculas de co-estimulación son más bajos que en las DCs maduras. Que ambos procesos de tolerancia, central y periférica, estén controlados por las DCs, se conoce gracias a que ratones a los que se les han removido estas células, presentan una pérdida de tolerancia y desarrollan enfermedades autoinmunes fatales. (Ohnmacht y *col.*, 2009). De esta manera, la respuesta que tendrán las células del sistema inmune

adaptativo es altamente dependiente del tipo de estímulo que éstas reciban de las DCs.

### 3.4 Diferenciación Linfocitaria

La respuesta inmune adaptativa esta mediada principalmente por dos mecanismos: la respuesta inmune humoral, controlada por linfocitos B, diferenciados y generados en la médula ósea de los vertebrados; y la respuesta inmune celular, la cual está controlada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, generados en el timo. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o T "helper" (Th) juegan un rol importante en el desarrollo de respuestas inmunes o de tolerancia, una vez han sido diferenciados a distintos subtipos, caracterizados por un patrón diferencial de expresión de citoquinas y por la expresión de factores de transcripción específicos. Estos linfocitos tienen un rango bastante amplio de funcionamiento, como son la activación de linfocitos B, células del sistema inmune innato o en la supresión de respuestas inmunes, en un proceso activo llamado tolerancia.

El proceso inicial para la diferenciación de los linfocitos Th es la exposición al complejo MHC-péptido presentado por las CPAs, además de la interacción de CD28 con su respectivos ligandos, CD80 y CD86. Este fenómeno genera la activación del TCR-CD3, como también de CD28, lo que conlleva la activación de cascadas de señalización que desencadenan proliferación celular y diferenciación a células T efectoras específicas. El fenotipo adquirido por las células emergentes, depende del microambiente de citoquinas, el tipo de CPA que haya presentado el antígeno e incluso su concentración (Ashkar, 2000). La diferenciación hacia el subtipo de linfocitos Th1 está mediada principalmente por las citoquinas IL-12 e IFN- $\gamma$  (Giorgio y *col.*, 2003), las cuales son secretadas por las DCs o las células NKT (Iwasaki and Medzhitov, 2004,

Trinchieri and Sher, 2007). Este subtipo celular se caracteriza por la secreción de IFN- $\gamma$  y la expresión del factor transcripcional Tbet, el cual además de propiciar la producción de esta citoquina, inhibe la diferenciación hacia los linajes Th2 y Th17 (Lazarevic y col., 2010, Lugo-Villarino y col., 2003). Inicialmente se creía que este perfil era el que controlaba los mecanismos que subyacen a la AR. Sin embargo, el hallazgo que reportó su rol inhibitor del perfil inflamatorio Th17 da claras señales de que existiría un rol protector en algunas enfermedades autoinmunes.

El perfil Th2 es propiciado por las citoquinas IL-4 e IL-2 y es el perfil que controla la erradicación de infecciones parasitarias. El factor transcripcional STAT6 es sobre expresado en estos linfocitos en respuesta a IL-4, lo que hace que aumente la expresión del factor transcripcional característico del perfil GATA3 (Mark y col., 1996, Zhu y col., 2001). Este factor transcripcional inhibe la diferenciación a linfocitos Th1 debido a una interacción con Tbet, lo que le otorgaría un rol protector en el control de algunas enfermedades autoinmunes (Zhu y col., 2005).

Por otro lado, las citoquinas IL-6, IL-21, IL-23 y TGF- $\beta$  controlan la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia el perfil Th17 y su factor transcripcional principal es el receptor huérfano-T asociado al receptor de ácido retinoico (ROR $\gamma$ -T, por sus siglas en inglés) (Mangan y col., 2006, Veldhoen y col., 2006, Volpe y col., 2008). Este subtipo celular secreta IL-17A e IL-17F, las cuales son altamente inmunogénicas y se cree que controla enfermedades autoinmunes como la AR o la esclerosis sistémica (van Hamburg y col., 2011, Wilke y col., 2011).

Finalmente, los linfocitos T reguladores inducidos (iTregs) son linfocitos que expresan el factor transcripcional FoxP3 y altos niveles del receptor de IL-2, CD25. En

contraste con los linfocitos T reguladores naturales (nTregs), los iTregs se generan en los órganos linfoides secundarios una vez que han recibido un estímulo antigénico por parte de iDCs. La citoquina TGF- $\beta$  e IL-2 son esenciales en la diferenciación de linfocitos T vírgenes a este subtipo celular, el cual es el principal responsable de controlar posibles eventos de autoinmunidad que ocurren en el organismo (Chen y *col.*, 2003, Li y *col.*, 2007). FoxP3, al ser el factor de transcripción que controla los cambios celulares hacia este fenotipo es crucial para la supervivencia, ya que se ha observado que ratones KO para este factor transcripcional desarrollan autoinmunidad fatal, correlacionado con una disminución en la cantidad de iTregs (Yagi y *col.*, 2004). Los altos niveles de CD25, molécula que le otorga la capacidad de captar la citoquina IL-2 del medio, compitiendo favorablemente por ésta con otros perfiles inflamatorios para su proliferación, la secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 por parte de un subtipo de Tregs y la expresión CTLA-4, una molécula de superficie capaz de competir como ligando por las moléculas co-estimuladoras presentes en las CPAs, hace a este perfil linfocitario especialmente efectivo para controlar eventos en los que se desconoce "lo propio" y se desarrollan reacciones autoinmunes exacerbadas.

En la Tabla 1 se resumen las características de algunos de los subtipos de linfocitos T CD4+ en cuanto a su secreción de citoquinas, su expresión de factores de transcripción específicos y su potencial rol en la homeostasis del organismo mediante el control de patógenos o prevención de autoinmunidad.

**Tabla 1 Subtipos de linfocitos T CD4+.** Se detallan distintos tipos de linfocitos T CD4+ junto con las citoquinas que secretan, su factor transcripcional maestro y su principal función en el organismo y posibles patologías asociadas a su incorrecto funcionamiento

<b>Subtipo de linfocito CD4</b>	<b>Citoquinas secretadas</b>	<b>Factor Transcripcional maestro</b>	<b>Función en homeostasis del organismo</b>
Th1	IFN- $\gamma$ , IL-2	Tbet	Eliminación de patógenos intracelulares, autoinmunidad órgano-específica
Th2	IL-4, IL-5, IL-9	GATA3	Eliminación de parásitos extracelulares, reacciones alérgicas
Th17	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22	ROR $\gamma$ -T	Eliminación de bacterias y hongos extracelulares, responsables de enfermedades autoinmunes
Treg	IL-25, TGF- $\beta$	FoxP3	Responsables de la tolerancia contra el organismo y antígenos externos. Relacionados a algunos tipos de cáncer



### 3.4 Antígenos en Artritis Reumatoide

La AR es considerada una enfermedad autoinmune típica. Sin embargo los autoantígenos que inician, controlan y perpetúan la enfermedad no están completamente descritos. Existe evidencia creciente que los péptidos que han sufrido una modificación post-traduccional llamada citrulinación podrían ser los causantes de gatillar la autoinmunidad (Eggleton y *col.*, 2008). Esta observación está estrechamente relacionada a la observación de ACPAs (anticuerpos anti péptidos citrulinados), capaces de reconocer un residuo de citrulina flanqueado por algún residuo neutro en la cadena peptídica (Sebbag y *col.*, 2006), en un gran porcentaje de los pacientes y concuerdan con la relación que existe entre la depleción de linfocitos B mediante terapias biológicas y la disminución de la inflamación en el tejido sinovial (Edwards y *col.*, 2004). Lamentablemente, las formas en que estos linfocitos B específicos para péptidos citrulinados llegan a activarse no están dilucidadas totalmente. Existen diversas proteínas que sufren el proceso de citrulinación y que son reconocidas por los ACPAs, entre las cuales se encuentran la filagrina, expresada en células epiteliales, vimentina, colágeno tipo I y II, enolasa, fibrina e incluso algunas proteínas virales, como EBNA-1 (Kinloch y *col.*, 2004, Masson-Bessière y *col.*, 2001, Pratesi y *col.*, 2006, Suzuki y *col.*, 2005). La gran variedad de auto-antígenos reconocidos por estos anticuerpos sugieren que la enfermedad podría ser iniciada a través de un mecanismo de mimetismo molecular y perpetuada a través de epítomos crípticos, presentes en péptidos que son presentados en bajas o nula frecuencia por las CPAs durante la selección tímica de linfocitos T CD4+ y que por lo tanto son reconocidos como extraños una vez que quedan expuestos a las células del sistema inmune (Warnock and Goodacre, 1997).

Se cree que el fluido sinovial de las articulaciones de pacientes con AR podría contener una gran diversidad de proteínas con propiedades auto-antigénicas debido a la degradación del cartílago a través de la producción de metaloproteinasas por parte de los macrófagos (Hain y col., 1996) y a la gran infiltración de linfocitos B y T CD4+. De esta manera, a través de distintas técnicas, como diversos métodos de separación por cromatografía acoplada a espectrometría de masa o Western blots de geles 2D se ha logrado, tanto conocer el proteoma del fluido sinovial, como algunas de las proteínas de éste que son reconocidas por el factor reumatoideo o ACPAs y otras capaces de estimular respuestas inflamatorias en linfocitos T CD4+ de sangre periférica de pacientes con AR *in vitro*, a través de ensayos de reacción mixta leucocitaria (Aggarwal y col., 2013, von Delwig y col., 2010). Por otro lado, un trabajo aun no publicado que se realiza actualmente en el laboratorio y que estudia la frecuencia con la cual algunos péptidos son presentados por moléculas de MHC-II en DCs maduras con monofosforil lípido A (MPLA) de donantes del haplotipo *HLA-DR\*0401*, el cual ha sido reportado como un factor de riesgo para contraer AR, indica que péptidos de anticuerpos del isotipo IgG son presentados en gran cantidad comparado con péptidos de otros tipos proteicos, lo que podría sugerir que estas proteínas tienen un rol auto-antigénico, idea apoyada por el alto título de factor reumatoideo encontrado en parte de los pacientes con AR.

Paralelamente, Jin y colaboradores demostraron que el MHC-II tiene la capacidad de transportar proteínas incorrectamente plegadas desde el interior de la célula hasta la superficie y observaron que en pacientes con AR, estos complejos moleculares eran capaces de movilizar anticuerpos del isotipo IgG no degradados asociándolo al bolsillo de unión al péptido. De esta manera, sueros de pacientes con AR, positivos para factor

reumatoideo lograban reconocer el complejo MHC-II/IgG, lo que podría indicar una mayor susceptibilidad a la enfermedad (Jin y col., 2014).

## **4. HIPÓTESIS**

El fluido sinovial de pacientes con AR posee fracciones enriquecidas en autoantígenos prevalentes capaces de inducir una respuesta en linfocitos T CD4+ efectores de pacientes con artritis reumatoide.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Demostrar la capacidad del fluido sinovial de pacientes con AR como fuente de antígenos para aplicaciones terapéuticas en AR utilizando células dendríticas.

### 5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Analizar la composición proteica del fluido sinovial de pacientes con AR a través de técnicas cromatográficas y electroforéticas.

5.2.2. Evaluar *in vitro* la respuesta de linfocitos T CD4+ encontrados en las células mononucleares de la sangre periférica de controles sanos o pacientes con AR al ser estimulados con fracciones de fluido sinovial.

5.2.3. Analizar *in vitro* la respuesta de linfocitos T CD4+ de pacientes con AR co-cultivados autólogamente con células dendríticas maduras con monofosforil lípido A (MPLA) pulsadas con fracciones de fluido sinovial.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de fracciones proteicas enriquecidas en autoantígenos prevalentes desde fluido sinovial de pacientes con AR

Las muestras de fluido sinovial fueron obtenidas mediante artrocentesis de las rodillas inflamadas de pacientes con AR. El procedimiento fue realizado por un reumatólogo de la Sección de Reumatología del hospital Salvador bajo los protocolos establecidos por dicha institución. Para la separación de la fracción celular del fluido sinovial, este se centrifugó a 1800 RPM por 5 min, tiempo tras el cual se recolectó el sobrenadante y se incubó con 100 U/ml de hialuronidasa de testículos bovinos por 60 min a 37°C para disminuir su viscosidad. Posteriormente la muestra centrifugada a 1800 RPM por 10 min y pasada por un filtro de 200 nm. Se recolectó una alícuota de 20 µl y realizó su cuantificación proteica a  $A_{562}$  a través del método BCA (Sigma Aldrich, MO, USA) según instrucciones del fabricante. Finalmente, la muestra se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización. Para la eliminación de albúmina, alícuotas de 200 µl de fluido sinovial fueron diluidas en buffer de depleción ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25 mM pH7) hasta alcanzar una concentración de 3,5 mg/ml (Echan y col., 2005). 100 µl del fluido sinovial fueron inyectados a una columna HiTrap Blue HP (Sigma Aldrich, MO, USA) de 1 ml anexada al sistema de FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare, UK), previamente equilibrado en buffer de depleción, la fracción que contenía proteína no unida, monitoreada por lectura de absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ), fue recolectada, cuantificada por el método BCA y concentrada en buffer de corrida de intercambio aniónico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20mM) hasta 1 mg/ml mediante ultra centrifugación a 4000 G por 75 min utilizando tubos Amicon de 15 ml de 3 KDa de poro (Merck Millipore, NJ, USA). Para el cálculo de la proporción de la albúmina eliminada,

se relacionó la concentración proteica al área bajo la curva medida a través del software UNICORN (GE Healthcare, UK) y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%albúmina\ eliminada = \frac{\text{Área de pico de albúmina} \times 100}{\text{Área pico de albúmina} + \text{Área proteína no retenida}}$$

100  $\mu$ l De la muestra concentrada fueron inyectados en una columna HiTrap Q HP de 1 ml (Sigma Aldrich, MO, USA) y corridos en buffer de corrida para separarlas según su carga. Para eluir las proteínas retenidas, se lavó la columna con buffer de elución ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$  20mM, NaCl 2M) a un flujo de 1 ml por minuto durante 60 min. Las fracciones proteicas, vistas por  $A_{280}$ , fueron recolectadas y cuantificadas a través del método BCA y finalmente dializadas contra RPMI (Life Technologies, USA) utilizando tubos Amicon hasta un volumen final de 75  $\mu$ l y almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso en ensayos funcionales.

## 6.2. Análisis electroforético de las fracciones de fluido sinovial

El análisis proteico de las fracciones de fluido sinovial se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El gel fue preparado a un 5% p/v de poliacrilamida y se cargó 1  $\mu$ g total de proteína, previamente denaturadas mediante un tratamiento con SDS a  $90^\circ\text{C}$  por 4 min, en cada pocillo. Las proteínas fueron resueltas a 150 V durante dos horas. Para la visualización de las bandas, el gel fue teñido durante 20 min con azul de Coomassie o con  $\text{AgNO}_3$ .

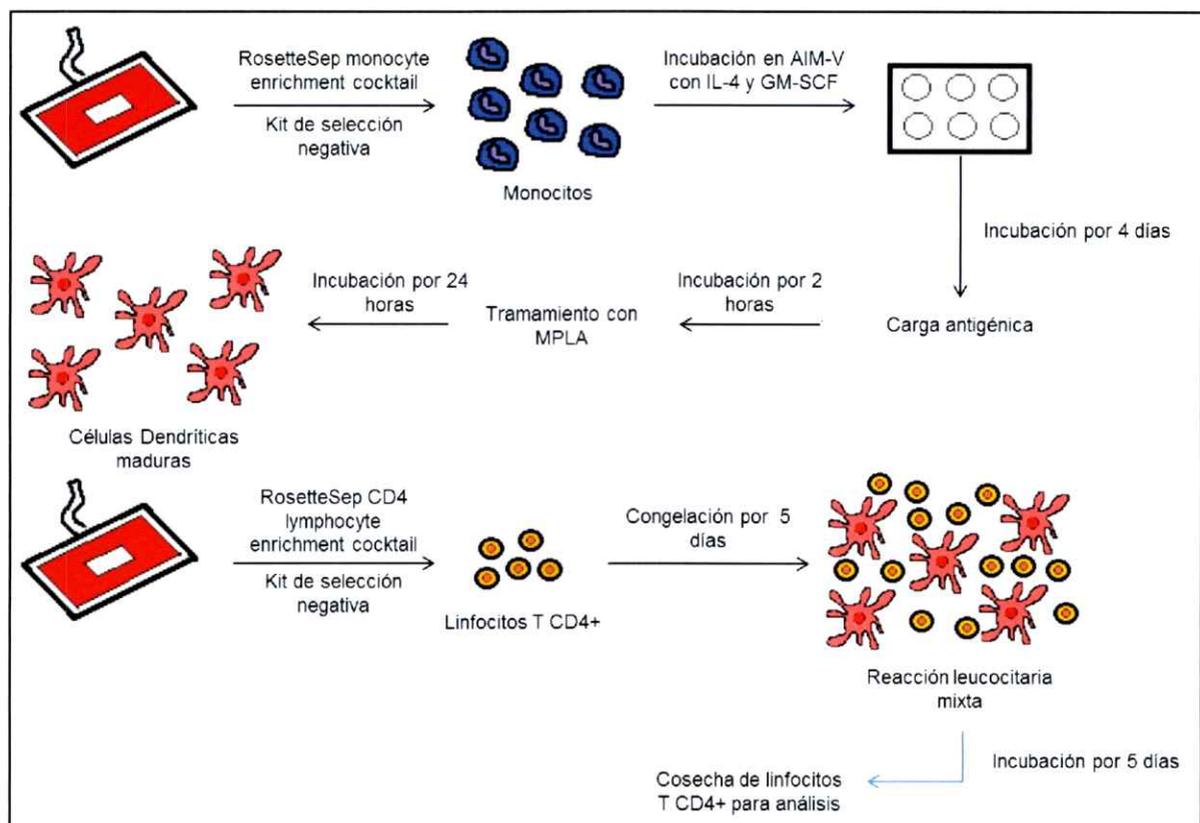
Para observar la presencia de anticuerpos de isotipo IgG, se realizó un Western Blot de las fracciones 2 y 6 del fluido sinovial de los pacientes 14 y 6, y 8 del fluido sinovial del paciente 17, utilizando 5  $\mu$ g de proteína total en cada caso para ser resueltos por SDS-PAGE. Una vez las proteínas estuvieron separadas, se realizó la

transferencia a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 190 mM, Metanol 20% v/v) a 400 mA por 2 h. Posteriormente la membrana fue bloqueada con TBS + leche descremada 5 % v/v durante 1 h e incubada con anticuerpo anti-IgG humano en una concentración de 0,2 µg/ml durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo, la membrana fue lavada e incubada con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa a una concentración de 10 ng/mL durante 1 h y detectado utilizando el kit de luminiscencia, capaz de sensar la presencia de peroxidasa, Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, OH, USA), según instrucciones del fabricante. La señal fue revelada utilizando un film fotográfico.

### **6.3. Obtención de PBMC, monocitos y linfocitos T CD4+ de pacientes con AR y controles sanos.**

En la Figura 2 se muestra un esquema de generación de DCs a partir de sangre periférica humana y el cocultivo celular con linfocitos T CD4+. Los concentrados leucocitarios (buffy coats) de sangre periférica de donantes sanos y leucoferatos de pacientes con AR fueron obtenidos del banco de sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile bajo los protocolos establecidos por dicha institución. Para la obtención de monocitos, las muestras fueron procesadas mediante un cóctel de enriquecimiento de monocitos CD14+ a través de selección negativa usando el kit RosetteSep (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) según las instrucciones del fabricante. Luego de la realización de un gradiente de ficoll (General Electric) según instrucciones del fabricante, la fracción enriquecida en monocitos fue resuspendida en PBS (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,0 mM; NaCl 1,55 M) suplementado con 2% v/v SBF y centrifugado a 1400 RPM por 5 min. Para eliminar los remanentes eritrocitarios

de la fracción monocítica, el precipitado fue resuspendido en ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,5 M;  $\text{KHCO}_3$  0,1 M;  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  1,0 mM) e incubado durante 7 minutos a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se completó el recipiente con PBS 2% v/v SBF y se centrifugó a 1400 RPM por 5 minutos. El precipitado fue resuspendido en PBS 2% v/v SBF y la viabilidad y conteo celular fueron cuantificados mediante método de exclusión con azul tripán en cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, PA, EUA). Para eliminar las plaquetas remanentes, la muestra fue centrifugada a 900 RPM por 10 minutos. Tras esto, los monocitos fueron resuspendidos en SBF a una concentración de  $80 \times 10^6$  células por ml.  $40 \times 10^6$  células fueron depositadas en un críotubo de 2ml donde lentamente se agregaron por las paredes 500  $\mu\text{l}$  de SBF 20%v/v dimetil sulfóxido (DMSO). Los tubos fueron congelados a  $-80$  °C por 24 horas, tiempo tras el cual las muestras fueron depositadas en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.



**Figura 2 Diferenciación de monocitos a células dendríticas (DCs) maduras y reacción leucocitaria mixta.** A partir de concentrados leucocitarios se enriqueció para monocitos CD14+ por selección negativa y se cultivaron por 5 días en presencia de IL-4 y GM-SCF. Al quinto día fueron pulsadas con el antígeno y se estimularon con MPLA. 24 horas después, las DCs fueron co-cultivadas por 5 días con linfocitos T CD4+ obtenidos a partir de concentrados leucocitarios, para el posterior análisis por citometría de flujo.

La purificación de linfocitos T CD4+ desde concentrados leucocitarios se realizó a través del cóctel de enriquecimiento de linfocitos CD4+, por selección negativa, RosetteSep (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), según las instrucciones del fabricante. Luego de la realización de un gradiente de ficoll, la fracción enriquecida en linfocitos T CD4+ fue resuspendida en PBS 2% v/v SBF y centrifugada a 1800 RPM por 5 min. Posteriormente, se resuspendió el precipitado en 3 ml de ACK y se incubó durante 7 min a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se completó el tubo con PBS 2% v/v SBF y se centrifugó a 1800 RPM por 5 min. El pellet fue resuspendido en PBS 2% v/v SBF y cuantificado mediante el método de exclusión de azul tripán en cámara de Neubauer, luego se centrifugó a 1800 RPM por 5 min y se resuspendió el precipitado en SBF a una concentración de  $160 \times 10^6$  de células por ml. Tras esto  $80 \times 10^6$  células fueron depositadas en un críotubo de 2 ml donde lentamente, y por las paredes, se agregaron 500  $\mu$ l de SBF 20% v/v DMSO. Luego, los tubos fueron congelados a  $-80^\circ\text{C}$  por 24 h, tiempo tras el cual las muestras fueron depositadas en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

La obtención de PBMC a partir de leucoferatos (pacientes con AR) y de concentrados leucocitarios (donantes sanos) se realizó a través de un gradiente de ficoll según instrucciones del fabricante. La fracción enriquecida en PBMC fue resuspendida en PBS 2% v/v SBF y centrifugada a 1800 RPM por 5 min. El precipitado fue resuspendido en 4 ml de ACK e incubado a temperatura ambiente durante 7 min, tiempo tras el cual se completó el tubo con PBS 2% v/v SBF y se centrifugó a 1800 RPM por 5 min. El pellet fue resuspendido en PBS 2% v/v y se cuantificaron las células a través del método de azul tripán en cámara de Neubauer. Finalmente, se centrifugó a 1800 RPM por 5 min y las células fueron resuspendidas en SBF a una concentración

de  $160 \times 10^6$  células por ml.  $80 \times 10^6$  células fueron depositadas en un criotubo al cual lentamente se le agregaron 500  $\mu$ l de SBF 20% v/v DMSO. Los tubos fueron congelados a  $-80$  °C por 24 h, tiempo tras el cual las muestras fueron depositadas en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

#### **6.4. Cultivo celular y ensayos de proliferación mediante reacción mixta leucocitaria**

Para el descongelamiento de los distintos tipos celulares (PBMC, monocitos y linfocitos T CD4+) de pacientes con AR o controles sanos, los criotubos fueron sacados del nitrógeno líquido y descongelados en agua tibia. Posteriormente, la suspensión celular fue resuspendida en RPMI + 10% v/v SBF tibio para linfocitos T CD4+ y PBMC, y AIM-V (Gibco BRT, Grand Island, NY, EUA) tibio para monocitos, y centrifugada a 1800 RPM por 5 min a temperatura ambiente. El precipitado celular fue resuspendido en RPMI + 10% v/v SBF o AIM-V según el tipo celular y contado a través del método de azul tripán en cámara de Neubauer.

Para los ensayos funcionales con PBMC, se plaquearon  $20 \times 10^6$  células en 5 ml de medio en placas de 6 pocillos y se dejaron descansar por 24 h a  $37$ °C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, las células fueron cosechadas cuidadosamente de la placa de cultivo utilizando un Cell Scraper (Thermo Scientific, OH, USA), contadas a través del método de azul tripán en cámara de Neubauer y centrifugadas a 1800 RPM por 5 min. Se tomó una alícuota de  $1 \times 10^6$  células, las cuales no recibieron tinción con CFSE como control para la citometría de flujo. El pellet fue resuspendido en RPMI fresco para alcanzar una concentración celular de  $40 \times 10^6$  millones por ml y se mezcló suavemente con el mismo volumen de CFSE diluido en RPMI para alcanzar una concentración final de  $5$   $\mu$ M. La suspensión celular fue incubada por 10 min a  $37$ °C, tiempo tras el cual se

rellenó el tubo con RPMI 10% v/v SBF y se centrifugó a 1800 RPM por 5 min. Se realizaron 2 lavados adicionales bajo las mismas condiciones y se contaron las células utilizando el método de azul tripán en cámara de Neubauer. El PBMC fue resuspendido en RPMI 10% v/v a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por ml y plaqueado en placas de 96 pocillos (300 $\mu$ l, Orange Scientific, Belgium). Para el análisis de proliferación antígeno específico, el PBMC fue pulsado con 1 mg/ml de fluido sinovial completo o 1, 5 o 10  $\mu$ g/ml de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio aniónico durante 5 días.

Los ensayos de reacciones mixtas leucocitarias fueron realizados a partir de células de pacientes o donantes sanos previamente congelados. Para descongelar monocitos y su diferenciación a DCs se resuspendieron en medio AIM-V (Gibco BRT, Grand Island, NY, EUA) tibio y se centrifugaron a 1400 RPM por 5 min. Tras esto, las células fueron contadas por el método de azul tripán en cámara de Neubauer y 2,5 ml fueron plaqueados a una concentración de  $2 \times 10^6$  células por ml. Luego de 24 h de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, el medio fue suplementado con rhIL-4 y rhGM-SCF a una concentración de 500 U/ml cada una. Al tercer día de cultivo se renovó el medio completamente con AIM-V con 500 U/ml de rhIL-4 y rhGM-SCF. Al día 4 de cultivo se observaron las células bajo el microscopio y se les tomaron fotografías utilizando una cámara digital Sony Cybershot. Posteriormente, las células fueron cosechadas de la placa mediante lavados repetitivos de los pocillos a con PBS frío a través de "up and down", fueron cuantificadas en una cámara de Neubauer y observó su viabilidad a través del método de exclusión de azul tripán. Las células fueron centrifugadas a 1400 RPM por 5 min y se resuspendieron en medio AIM-V a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por ml. Luego, se plaquearon  $1 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 96

pocillos y se estimularon con 5 µg/ml de cada una de las fracciones obtenida por cromatografía de intercambio aniónico. Tras 4 h, se enjuagaron las células con RPMI fresco y se estimularon con 1 µg/ml de MPLA (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) por 24 h. Al quinto día de cultivo, se descongelaron linfocitos CD4+ de pacientes AR o donantes sanos, resuspendiéndolos en RPMI 10% v/v SBF y se centrifugaron a 1800 RPM por 5 min. Luego se resuspendieron a una concentración de  $40 \times 10^6$  de células por ml en RPMI fresco y se agregó el mismo volumen de CFSE diluido en RPMI para alcanzar una concentración final de CFSE de 5 µg/ml. Tras una incubación de 10 min a 37°C, se completó el tubo con RPMI 10% v/v SBF y se centrifugó a 1800 RPM por 5 min, procedimiento que se repitió otras 2 veces. Finalmente, las células fueron resuspendidas a una concentración de  $6,6 \times 10^5$  células por ml en RPMI 10% v/v SBF. Se retiró el medio AIM-V de las DCs previamente plaqueadas en placas de 96 pocillos y se depositaron  $2 \times 10^5$  linfocitos T CD4+ sobre cada pocillo para ser cultivados por 6 días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al sexto día, se retiró la mitad del medio de cultivo a cada pocillo, se agregó PMA a 50ng/ml, ionomicina a 1 µg/ml y brefeldina y se incubó por 5 h a 37°C para luego ser analizados por citometría de flujo.

### **6.5. Citometría de flujo**

Los anticuerpos utilizados en el trabajo fueron los siguientes: anti (α-) CD4 APC, α- CD4 PeCy7, α- IFNγ PeCy7 y α- IL17 APC, (eBioscience).

Para la realización de la tinción de moléculas de superficie, tras los respectivos días de cultivo,  $2 \times 10^5$  células fueron transferidas a placas de 96 pocillos de fondo cónico (Nunc) y centrifugadas a 2000 RPM por 2 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y las células resuspendidas en 100 µl de PBS 10% v/v SBF con α-CD4 e

incubadas en oscuridad por 30 min a 4°C. Tras este tiempo y para realizar la tinción intracelular, las células fueron lavadas dos veces con PBS 3% v/v SBF y resuspendidas en 100 µl de buffer Fixation/Permeabilization (Life Technologies, USA) en incubados en oscuridad por 30 min a 4°C. Transcurrido dicho tiempo se agregaron 200 µl de Permeabilization Buffer (Life Technologies, USA) y se centrifugó a 2000 RPM por 2 min a 4°C, proceso que se repitió 2 veces. Las células fueron resuspendidas en 100 µl de Permeabilization Buffer, se agregaron los anticuerpos  $\alpha$ -IFN $\gamma$  PeCy7 y  $\alpha$ -IL17 APC a la concentración indicada por el fabricante y se incubó en la oscuridad por 30 min a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas otras 2 veces con Permeabilization Buffer y resuspendidas para su análisis en FACS (Becton Dickinson). Por otro lado, los linfocitos fueron incubados con Anexina-V (eBioscience) y  $\alpha$ -CD4 APC para analizar su viabilidad. Las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACScalibur, usando el programa computacional Cell Quest Pro (Becton Dickinson), y analizadas posteriormente con el programa computacional Weasel (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia).

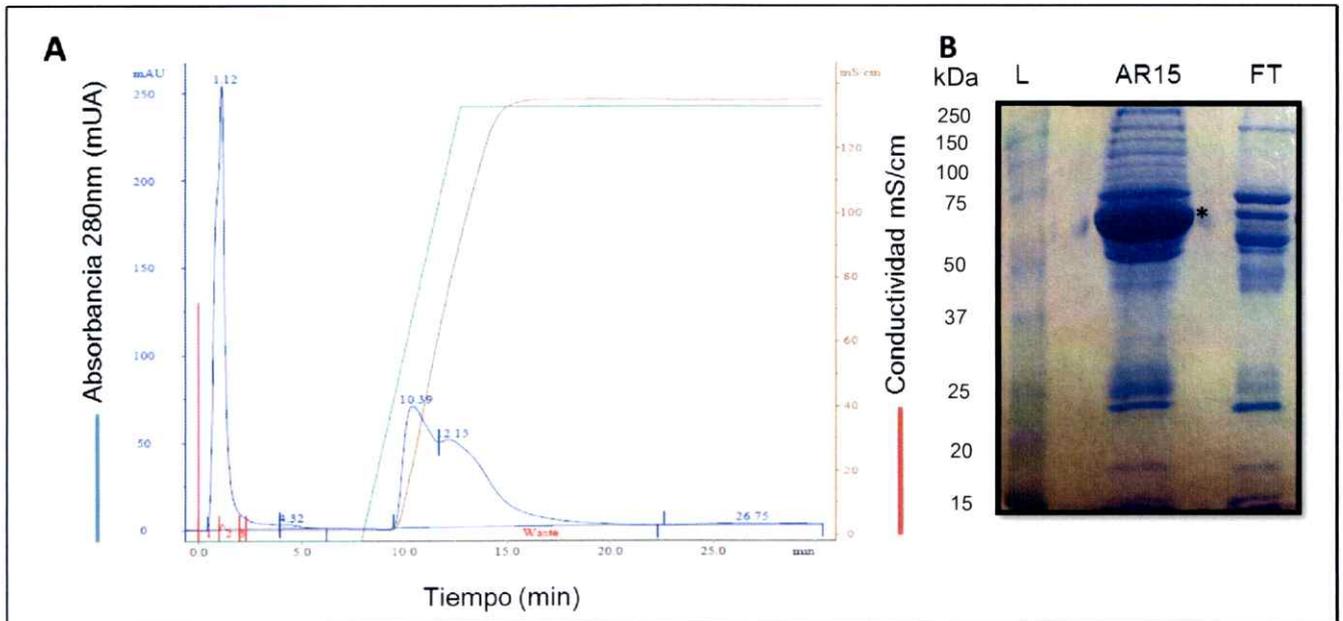
## 6.6 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa Graph Pad Prism v5.01 para Windows (San Diego, CA, USA). Para el análisis estadístico y la determinación de significancia se utilizó un ensayo de ANOVA de una vía con una prueba de Tukey como post-test. Los valores considerados como significativos fueron \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. El fluido sinovial de pacientes con AR presenta altos niveles de albúmina y un perfil proteico característico

Distintas muestras de fluido sinovial de pacientes con AR y con osteoartritis (OA) fueron inicialmente depletadas de su contenido de albúmina mediante cromatografía de afinidad (HiTrap Blue). Como se observa en la Figura 3A, el contenido de albúmina en ambas muestras se separó y alcanzó un  $60,05 \pm 1,72$  % de proteína total (Tabla 2). La fracción eluída fue comparada con el fluido sinovial completo en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomasie. Se observó una importante disminución de una banda proteica (~65 kDa) similar al tamaño reportado para la albúmina humana. Sin embargo, la depleción de albumina también eliminó otras proteínas presentes en el fluido sinovial, como se observó en la tinción con azul de Coomasie (Figura 3B).



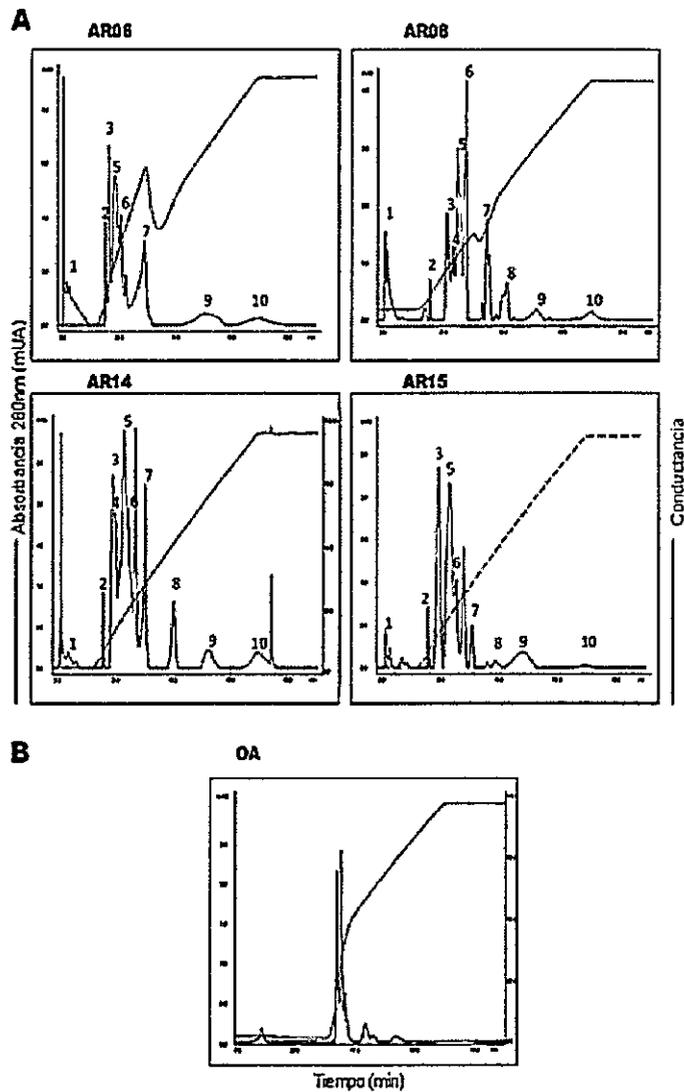
**Figura 3 Depleción de albúmina de fluido sinovial de pacientes con AR a través de cromatografía de afinidad.** Con el fin de facilitar el análisis proteico y de remover proteínas no relevantes para el estudio de la estimulación de linfocitos efectores, (A) se removió la albúmina del fluido sinovial de pacientes con AR a través de cromatografía de intercambio aniónico. La línea verde representa el cambio de buffer para la elución de la albúmina de la columna. La línea café representa la conductividad de la muestra. Los números y líneas rojas representan los momentos en los que se recolectaron las fracciones para su posterior análisis (B) Posteriormente se resolvió el fluido sinovial completo y la fracción depletada de albúmina (FT) a través de SDS-PGE y posterior tinción con azul de Coomasie. L representa el ladder de tamaño molecular y el \* representa una banda de 64,8 kDa correspondiente a la albúmina humana presente en el FS. Imágenes representativas correspondientes al FS del paciente AR08.

**Tabla 2: Áreas bajo la curva en el análisis para el análisis de remoción de albúmina:** Las áreas bajo las curvas de los picos cromatográficos fueron calculadas mediante el programa UNICORN (GE Healthcare, UK) y el porcentaje de albúmina removido fue calculado a partir de los datos

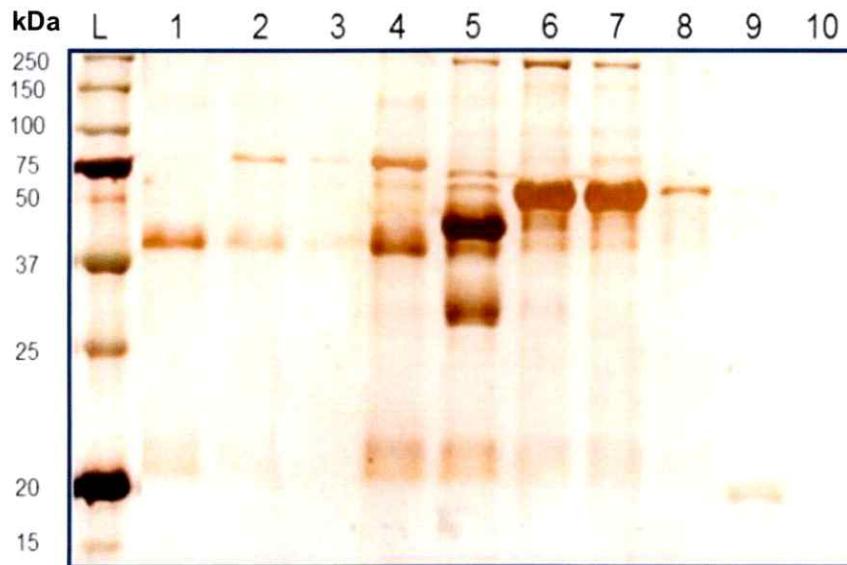
<b>Fluido Sinovial</b>	<b>Área proteína no unida (mUA x min)</b>	<b>Área albúmina (mUA x min)</b>	<b>Área total</b>	<b>Porcentaje albúmina</b>
<b>AR6</b>	154,59	253,75	408,34	62,14
<b>AR8</b>	252,10	239,44	491,54	48,71
<b>AR14</b>	96,796	176,87	273,66	64,62
<b>AR15</b>	160,72	289,24	449,96	64,28

Las fracciones eluidas de la columna de afinidad para albúmina fueron recolectadas y concentradas mediante ultra-centrifugación, para luego ser inyectadas (100  $\mu$ l) a una columna de intercambio aniónico (HiTrap Q) donde se realizó su separación proteica. Los fluidos sinoviales de pacientes con AR no presentaron una variación considerable en su perfil proteico entre las muestras provenientes de distintos individuos. La Figura 4A muestra el perfil de elución de 4 muestras distintas de fluido sinovial de pacientes con AR observándose al menos 10 picos con tiempos de retención similares. Como control el fluido sinovial se utilizó una muestra de un paciente con OA. A pesar de observar algunos picos con tiempos de retención similares, el perfil proteico obtenido difiere en la resolución obtenida y en la cantidad de picos observados en las muestras de pacientes con AR (Figura 4B).

Las fracciones obtenidas mostraron distintos grados de separación proteica, como se pudo observar al separar las fracciones mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 5). En las fracciones 1, 2 y 3 se observó una proteína predominante de aproximadamente 40 kDa. Por otro lado, en las fracciones 2, 3 y 4 se observó la presencia de una proteína de 80 kDa. La separación proteica de las fracciones 4, 5, 6, 7 no se logró en su totalidad ya que se observaron varias bandas proteicas separadas en el rango de tamaño molecular analizado. Finalmente, las fracciones 8 y 9 lograron ser purificadas casi completamente ya que se observó solo dos bandas proteicas correspondientes a 20 y 50 kDa. Finalmente no se logró cuantificar ni observar proteínas en la fracción 10.



**Figura 4** Separación proteica del fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) mediante cromatografía de intercambio aniónico. La fracción de fluido sinovial libre de albúmina fue concentrada e inyectada a una columna HiTrap Q de intercambio aniónico. (A) Cromatogramas de la corrida de fluidos sinoviales de cuatro distintos pacientes a través de la columna de intercambio aniónico. (B) Cromatograma de la corrida de un fluido sinovial de un paciente con OA por una columna de intercambio aniónico. 7,5 mg/ml de muestra fueron inyectados para el análisis los análisis cromatográficos.

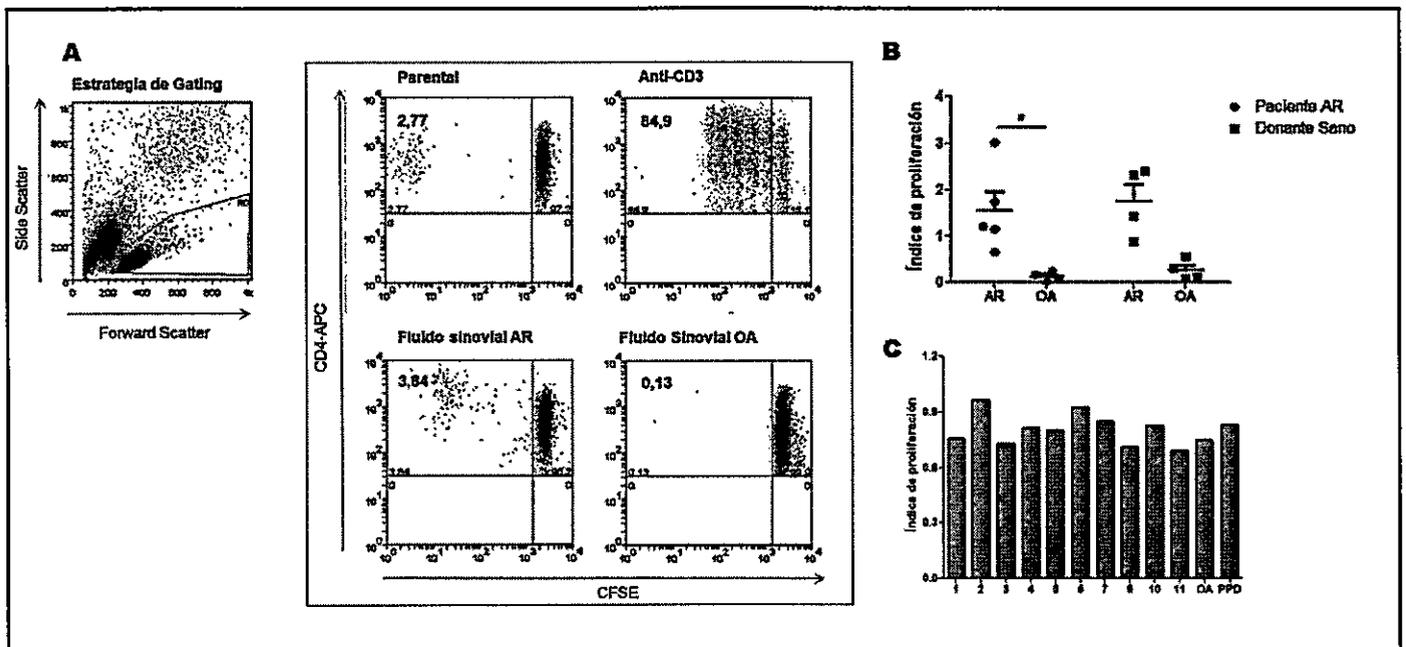


**Figura 5 Análisis electroforético de las fracciones obtenidas mediante intercambio aniónico del FS AR08:** Se cargó 1  $\mu\text{g}$  de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio aniónico por pocillo y luego fueron analizadas a través de SDS-PAGE con una concentración de 10% finalmente, las bandas fueron visualizadas a través de tinción de plata. L representa ladder de tamaño molecular. Los números sobre cada carril representan el número de cada fracción obtenidas mediante cromatografía de intercambio aniónico

## **7.2. Respuesta proliferativa de PBMC a fluido sinovial de pacientes con AR o con OA.**

Para evaluar la capacidad inductora de la proliferación por parte del fluido sinovial completo de pacientes con AR, células mononucleares de sangre periférica de pacientes con AR purificadas desde un concentrado leucocitario fueron teñidas con CFSE, pulsadas con 200 µg/ml del fluido sinovial y cultivadas durante 5 días. El fluido sinovial de pacientes con OA fue utilizado como control negativo debido a su condición de enfermedad degenerativa no inflamatoria. Tanto los linfocitos T CD4+ de pacientes con AR como los de controles sanos mostraron una proliferación preferencial por el fluido sinovial de pacientes con AR en comparación al control con fluido sinovial de OA (Figura 6A). Como control se pulsaron linfocitos T CD4+ con anti-CD3 y además se plaquearon linfocitos T CD4 sin DCs a modo de control parental. Esta proliferación alcanzó significancia estadística en el caso de las células de pacientes y no en controles (Figura 6B).

Por otro lado, PBMC de pacientes con AR fueron estimulados con las fracciones de fluido sinovial separadas mediante cromatografía de intercambio aniónico y con derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* como control positivo. Sin embargo, no fue posible observar un aumento en la proliferación en respuesta a ninguna de las fracciones proteicas en comparación al control de células sin carga (Figura 6C).



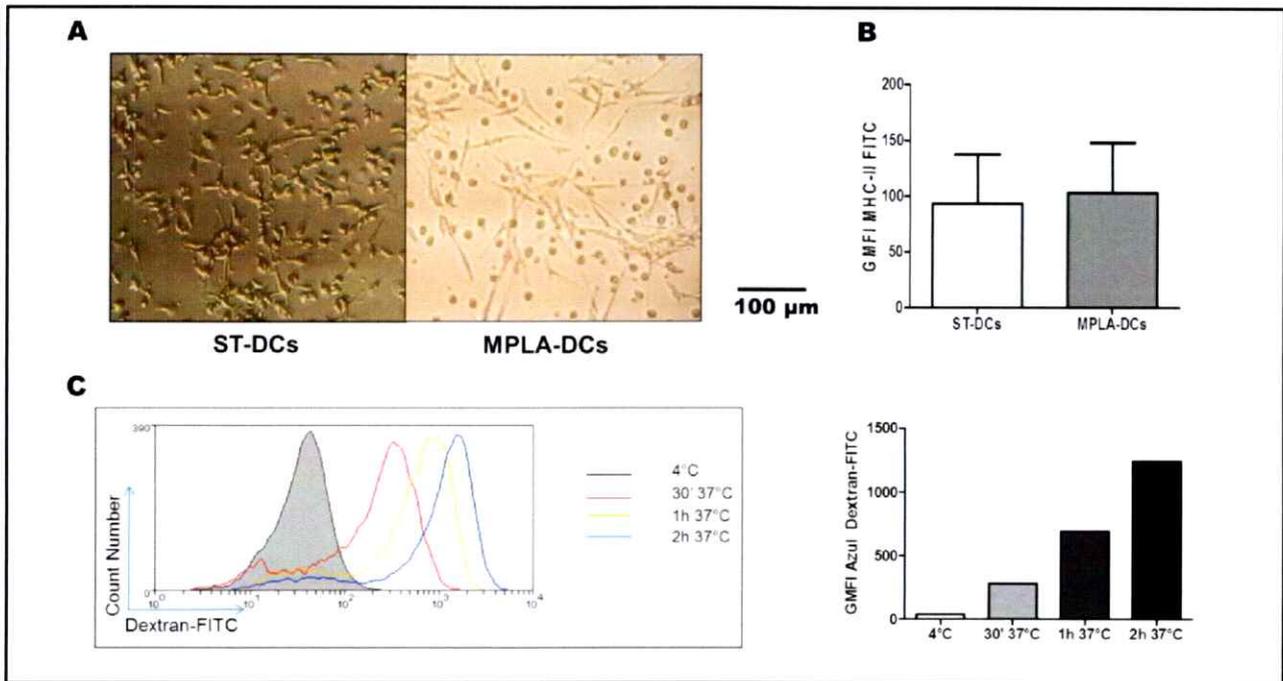
**Figura 6** Respuesta proliferativa de PBMC de pacientes con artritis reumatoide (AR) y donantes sanos a estimulación con fluido sinovial de pacientes con AR o con osteoartritis (OA). (A) Criterios de selección mediante "Forward Scatter", tamaño y "Side Scatter", granularidad de la población linfocítica (R0, gráfico de la izquierda). La proliferación celular en respuesta a los distintos fluidos sinoviales fue medida a través de la dilución de la marca de CFSE en la población positiva para CD4. El control parental fue estimulado con PBS y como control positivo se estimuló el PBMC con anti-CD3. (B) Gráfico de Índice de proliferación (proliferación en respuesta al estímulo dividido por la proliferación basal) de las células CD4 de donantes sanos y pacientes con AR en respuesta a los distintos fluidos sinoviales (AR y OA) N=4, \*p<0,05. (C) Gráfico de Índice de proliferación de células CD4+ en respuesta a las distintas fracciones de fluido sinovial N=1. El derivado proteico purificado de Mycobacterium tuberculosis PPD fue empleado como control positivo para pulsar los PMBCs.

### **7.3. Respuesta proliferativa de linfocitos T CD4+ en respuesta a fracciones proteicas de fluido sinovial de pacientes con AR.**

De modo de realizar un ensayo más limpio y reproducible para el estudio de la respuesta de linfocitos T CD4+ de pacientes con AR, el estímulo con fluido sinovial o las fracciones proteicas purificadas se realizó a través de la pulsación de DCs maduras que actuaron como CPAs. Para ello, se aislaron monocitos de sangre periférica de pacientes con AR y se trataron con IL-4 y GM-SCF durante 5 días. Al quinto día de cultivo, las células fueron pulsadas con los antígenos y 4 horas después estimuladas con MPLA para madurarlas. Al momento del cultivo, se logró observar como las células tratadas con MPLA prolongaban su cuerpo celular en una forma similar a las dendritas neuronales y adquirían una morfología "estirada" en relación a las células que no fueron tratadas con MPLA (Figura 7A). Además, no se observó una diferencia importante en la expresión de las moléculas MHC-II (Figura 7B).

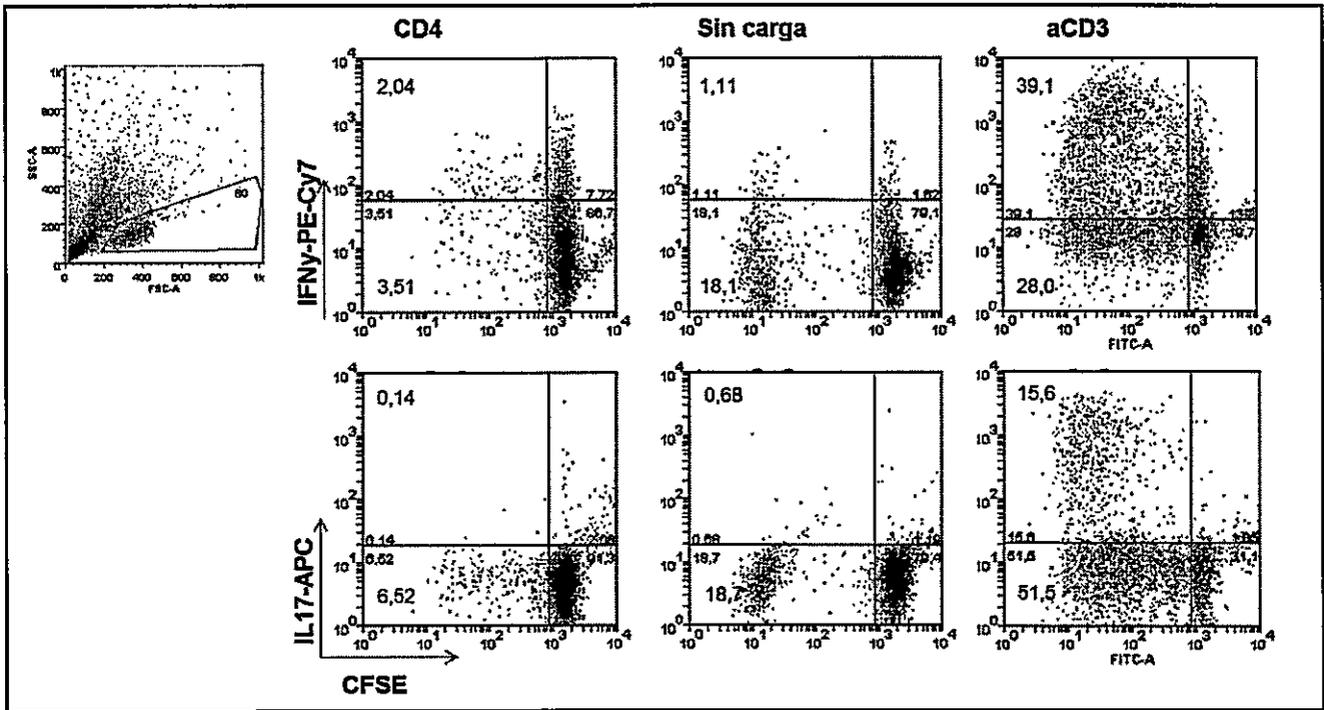
Para estandarizar las condiciones ideales para ejecutar el co-cultivo de DCs pulsadas con antígeno, se realizó una cinética de la endocitosis de azul dextrán con el fin de encontrar el mejor tiempo para pulsarlas con MPLA, ya que se ha documentado que las DCs maduras poseen una baja capacidad de captura antigénico. Como control negativo se cultivaron células a 4°C pulsadas con 1µg/ml de azul dextrán. Por otro lado, se pulsaron células con la misma concentración de azul dextrán conjugado a FITC y se cultivaron a 37°C por distintos tiempos. Se observó que una vez transcurridas 2 horas a partir de la estimulación, las células endocitaban la mayor

cantidad de azul dextrán (Figura 7C). Se escogió ese tiempo para la estimulación con MPLA luego del pulso con las distintas fracciones antigénicas.



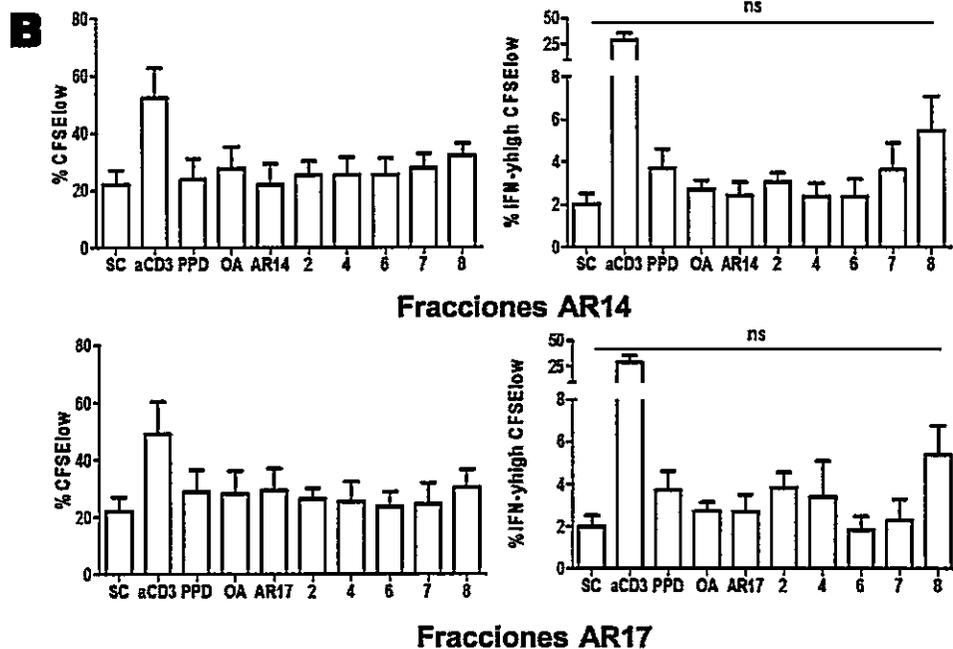
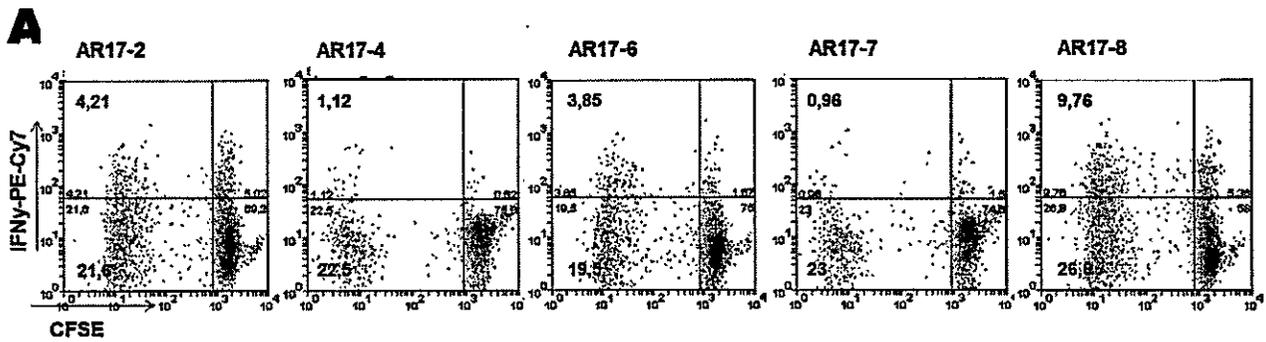
**Figura 7 Perfil fenotípico de células dendríticas (DCs) maduras con monofosforil lípido A (MPLA).** (A) Morfología de DCs al quinto día de cultivo sin estimulación (izquierda) y estimuladas con MPLA (derecha). La barra a la derecha representa una escala de medición para las imágenes. (B) Intensidad geométrica media de la fluorescencia (GMFI) de la expresión de MHC-II en células no estimuladas (ST-DC) y estimuladas con MPLA (MPLA-DCs) N=4. (C) Cinética de capacidad endocítica de células dendríticas previo a su maduración N=1.

Para analizar *in vitro* la respuesta de los linfocitos de pacientes con AR, estos fueron teñidos con CFSE y cultivados con DCs maduras con MPLA (MPLA-DCs) durante 6 días. Al sexto día de cultivo y luego de una estimulación con PMA y ionomicina en presencia de brefeldina, la proliferación de los linfocitos fue analizada además de la presencia de citoquinas intracelulares. Como control se decidió analizar la proliferación basal de los linfocitos T CD4+, además de la proliferación en respuesta a DCs, a las cuales no se las había cargado con antígenos. Finalmente, para observar si los linfocitos T CD4+ eran capaces de responder a estímulos inflamatorios, se les estimuló con  $\alpha$ CD3 (Figura 8). De esta manera se observó que los linfocitos T CD4+ presentaban bajos niveles de proliferación, donde solo el 5% de estos perdía marca de CFSE además secretaban bajos niveles de IL-17 e IFN- $\gamma$  (0,14% y 2,04% respectivamente). Por otro lado, cerca del 20% de los linfocitos en co-cultivo con DCs no cargadas con antígeno proliferaron en respuesta al estímulo y además secretaban aproximadamente un 2% de IL-17 e IFN-  $\gamma$ . Finalmente, se observó que los linfocitos retenían su capacidad de reaccionar ante estímulos inflamatorios, ya que al ser estimulados con  $\alpha$ CD3, su proliferación alcanzaba al 50% aproximadamente, además de altos niveles de producción de IL-17 e IFN-  $\gamma$ .



**Figura 8. Respuesta linfocitaria basal.** Para evaluar las características basales de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con AR luego de su descongelación, estos fueron cultivados durante 5 días en ausencia de DC (CD4), en presencia de MPLA-DCs sin cargadas con antígeno (Sin Carga) y en presencia de  $\alpha$ -CD3 (aCD3). Se evaluó su capacidad proliferativa mediante dilución de marca de CFSE y su capacidad de secretar IL-17 e IFN- $\gamma$  a través de tinción intracelular y citometría de flujo.

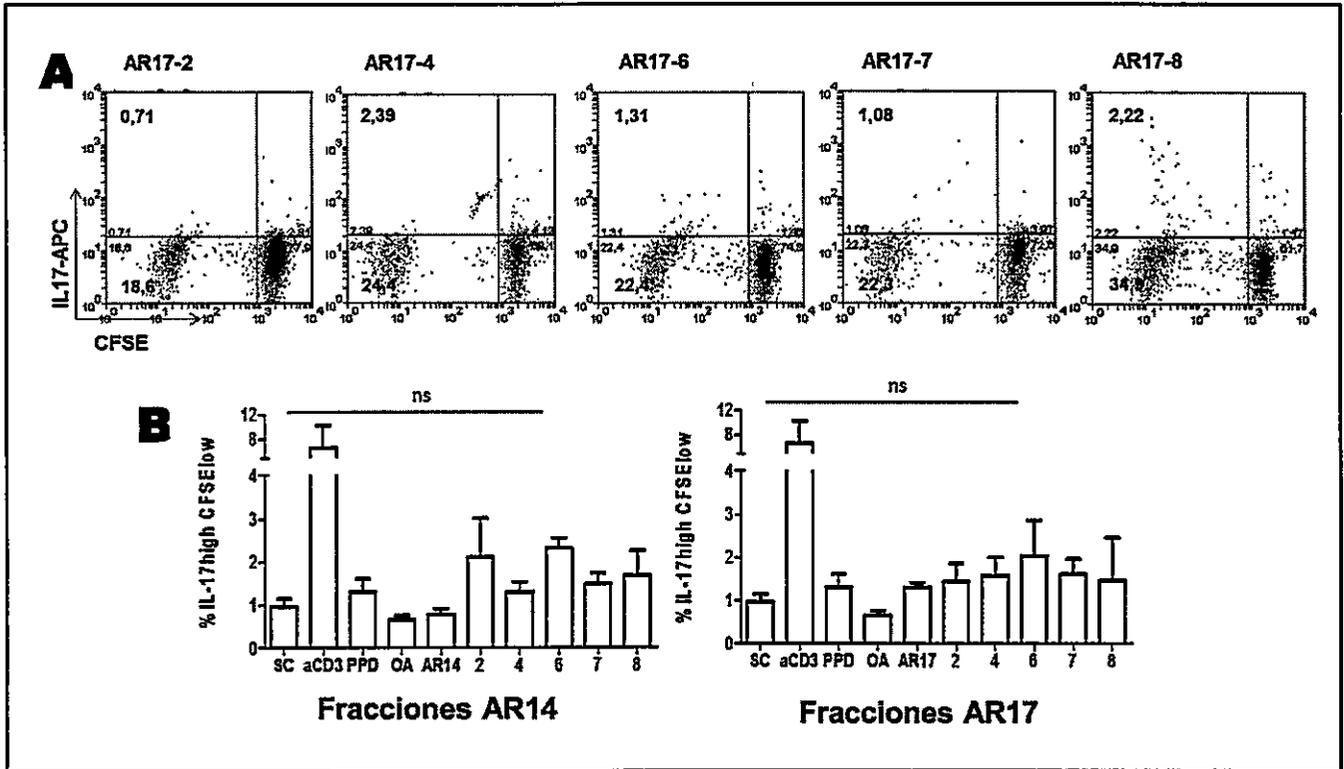
Como se observa en la Figura 9, los linfocitos reaccionan diferencialmente a los distintos antígenos a los que fueron expuestos, siendo especialmente notoria la diferencia en el porcentaje de linfocitos que secretan IFN- $\gamma$  en respuesta a las fracciones número 7 y 8 del fluido sinovial 14; y 2, 4 y 8 del fluido sinovial 17, alcanzando niveles comparables, e incluso superiores a linfocitos T CD4+ estimulados por DCs pulsadas con PPD, pero significativamente más bajos que linfocitos estimulados con anti-CD3.



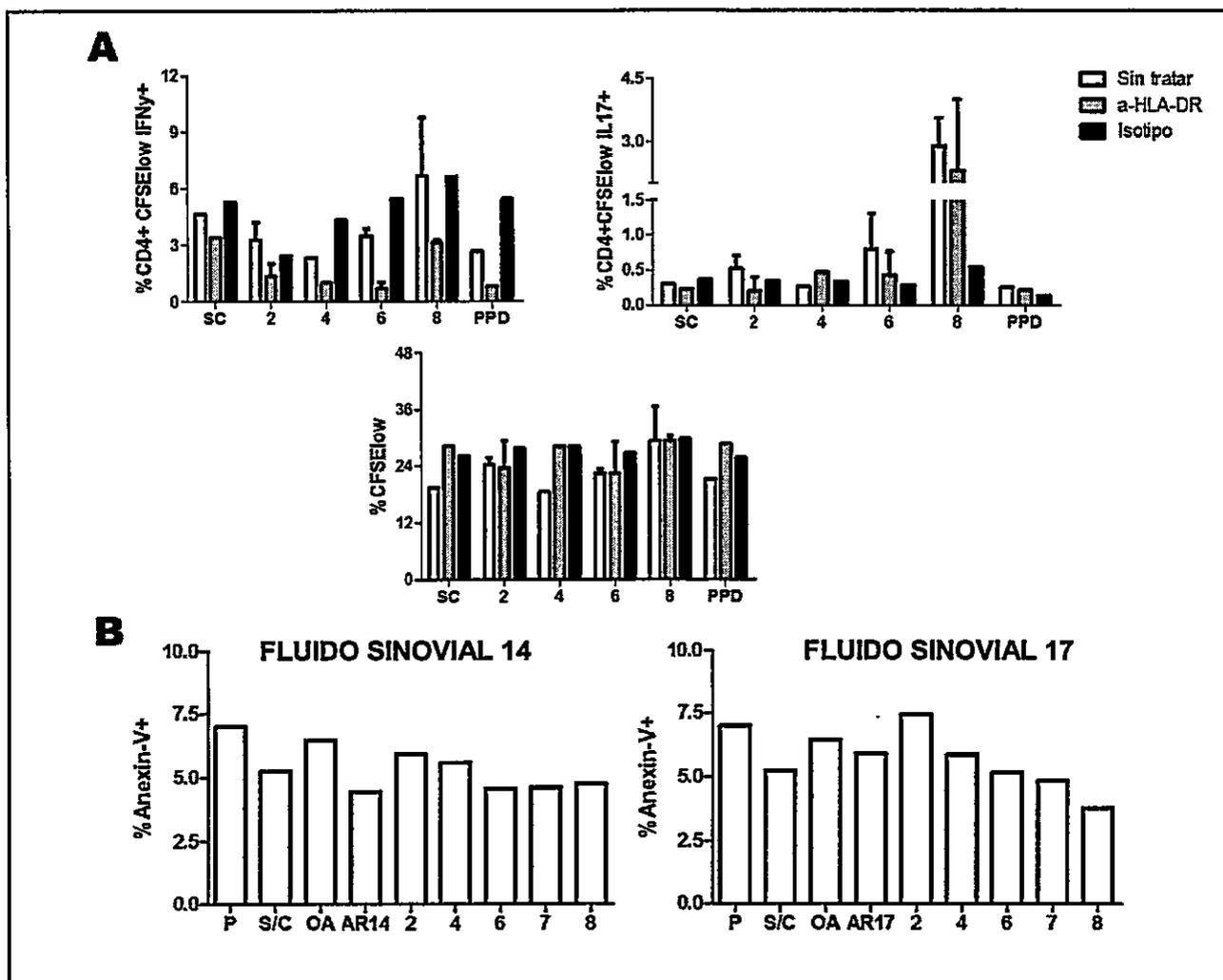
**Figura 9. Respuesta antígeno específica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con AR a fracciones de FS obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico. (A) Dot plots representativos adquiridos utilizando la estrategia de gating observada en la Figura 8 de marca de tinción intracelular de IFN- $\gamma$  en respuesta a estimulación con el FS del paciente AR17. La proliferación celular fue medida a través de la dilución de la marca de CFSE. Los porcentajes de proliferación y de citoquinas producidas se encuentran dentro de cada cuadrante. (B) Porcentajes de proliferación y secreción de IFN- $\gamma$  y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con AR en respuesta a la estimulación antígeno específica con fracciones de FS del paciente AR14 (fila superior) o AR17 (fila inferior). ns = no significativo, N = 4.**

Por otro lado, se observó un aumento en la población de linfocitos proliferantes que secretan IL-17 en respuesta a las fracciones 2 y 6 del fluido sinovial 14 y 6 del fluido sinovial 17 (Figura 10). Teniendo en cuenta estos resultados, y observando que los niveles de proliferación registrados no variaron en respuesta a los antígenos con los que las DCs fueron pulsadas, se propone que las diferencias en la secreción de citoquinas se podría deber preferencialmente a un cambio fenotípico a nivel celular, en el que linfocitos ya diferenciados adquieren un nuevo perfil de secreción de citoquinas, por sobre una expansión clonal preferente de poblaciones ya diferenciadas.

Para corroborar que las respuestas observadas fueran antígeno-dependientes, se agregaron 5 µg/ml de anti HLA-DR (eBioscience), 10 minutos antes de pulsar las células con las fracciones de fluido sinovial. La producción de IFN-γ y disminuyó cuando la molécula de MHC-II fue bloqueada. Sin embargo, no se observaron diferencias en la producción de IL-17 ni en la proliferación linfocitaria (Figura 10A). Por otro lado, se midió la viabilidad celular mediante la tinción con Anexina-V, lo que no evidenció diferencias entre los distintos antígenos a los que fueron expuestos las DCs en el co-cultivo (Figura 10B).



**Figura 10. Producción de IL17 por parte de linfocitos T CD4+ de pacientes con AR en respuesta a la estimulación con fracciones de FS obtenido a través de cromatografía de intercambio aniónico. (A) Dot plots representativos utilizando la estrategia de gating mostrada en la Figura 8 de la marca de tinción de IL-17. La secreción de IL-17 fue medida a través de tinción intracelular. Los porcentajes de secreción de citoquinas y proliferación se observan dentro de cada cuadrante. (B) Porcentaje de producción de IL-17 por parte de linfocitos T CD4+ de pacientes con AR en respuesta a fracciones del FS del paciente AR14 (izquierda) o AR17 (derecha). ns = no significativo, N = 4**



**Figura 11** La respuesta de los linfocitos T CD4+ productores de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) de pacientes con artritis reumatoide (AR) es antígeno específica y la estimulación antigénica con fracciones antigénicas de fluido sinovial de pacientes AR no influencia la viabilidad celular. (A) Porcentajes de producción de IFN- $\gamma$  (arriba izquierda), IL-17 (arriba derecha) y proliferación celular (abajo) de linfocitos T CD4+ en respuesta a estimulación con fracciones antigénicas de fluido sinovial de pacientes con AR y bloqueo de moléculas MHC-II a través de un anticuerpo anti-MHC-II. N = 2 para fracciones 2, 6 y 8 y N = 1 para condición sin carga (SC), 4 y PPD. (B) Porcentaje de células positivas para Anexina-V al quinto día de co-cultivo de DCs pulsadas con fracciones de fluido sinovial 14 (izquierda) o 17 (derecha) N = 1.

## 8. DISCUSIÓN

El uso de terapias celulares que involucren la generación de tolerancia es un tema en boga para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado en diversos estudios que la aplicación de DCs inmunomoduladas con distintos fármacos, cócteles de citoquinas o modificadas genéticamente han sido aproximaciones promisorias para la mejoría de este tipo de enfermedades. Sin embargo, uno de las principales dificultades ha sido la búsqueda de los antígenos para la carga de las DCs debido a la complejidad propia de cada patología. A pesar del trabajo en modelos animales controlados en el que se puede observar las ventajas de terapias con DCs en un ambiente totalmente controlado, la AR en humanos es una enfermedad multifactorial para la cual se conoce una gran diversidad de antígenos a los que se dirige la exacerbada respuesta inmune del organismo, causando daños devastadores para el paciente tanto sistémicos como en las articulaciones.

La presente memoria de título tuvo como principal objetivo analizar la capacidad autoantigénica del fluido sinovial de pacientes con AR para la carga de DCs tolerogénicas generadas *ex vivo* como posible tratamiento para la AR. Por lo que se analizaron los componentes proteicos de fluidos sinoviales de pacientes con AR a través de cromatografía de intercambio aniónico. Luego estas fracciones fueron usadas para pulsar DCs maduras con MPLA para observar la respuesta proliferativa y de secreción de citoquinas de linfocitos T CD4+ a través de un ensayo de reacción leucocitaria mixta.

### 8.1 Separación proteica del fluido sinovial

Se observó que el fluido sinovial de pacientes con AR presentaba grandes cantidades de albúmina, llegando a representar, en algunos casos, hasta el 64% de la cantidad de proteína total encontrada. Esta característica concuerda con lo reportado en estudios previos para pacientes con AR (referencia). Sin embargo, no es una característica relevante para el desarrollo de la enfermedad, debido a que el fluido sinovial normalmente presenta diversas cantidades de proteínas exudadas desde el plasma sanguíneo, las que le otorgarían algunas características nutricionales y mecánicas para la protección de las células que conforman la articulación. Por lo demás, no se han reportados péptidos de la albúmina que se relacionen a la AR. Mediante cromatografía de afinidad, se logró remover gran parte de la albúmina (Figura 3A) hasta niveles donde se logró observar la separación de otras proteínas que pudieran ser más relevantes como auto-antígenos. Después de la depleción de albúmina, se observó un perfil de elución característico representado en el cromatograma como un doble pico a los 10 y 12 minutos respectivamente. Esto probablemente se debe a que la purificación no solo separó albúmina del fluido sinovial, sino que también otras proteínas, lo que pudo ser corroborado a través de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomasie (Figura 3B). Este fenómeno representó un problema para el desarrollo de este trabajo, ya que proteínas con capacidades antigénicas pudieron haber sido removidas durante este crucial paso. Sin embargo, debido a la cantidad limitada de muestras de FS, no se logró obtener grandes concentraciones de las proteínas separadas para su futuro análisis funcional. Por otro lado, se ha reportado que la albúmina presenta 2 isoformas distintas, en el que el residuo Cys34 presenta distintos estados de oxidación, esto pudo haber afectado los tiempos de retención al interior de la columna (Turell y *col.*, 2013).

Por otro lado, cuando la fracción de fluido sinovial fue corrida por la columna de intercambio aniónico, se observó su separación en aproximadamente once distintos picos proteicos, con algunas variaciones entre los distintos fluidos sinoviales. La fracción que no fue retenida en la columna (proteínas con un punto isoelectrico menor al pH del buffer de equilibrio) eluyó inmediatamente después de la inyección de la muestra y en algunos casos logró ser separada en dos picos distintos. A pesar de que éstas no lograron ser separadas con una mayor precisión según su punto isoelectrico, se alcanzó una pureza casi total, lo que pudo ser corroborado por la baja cantidad de bandas observadas en un gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, solo logrando observar 2 de 40 y 80 kDa aproximadamente (Figura 5, fracción 1 y 2). La fracción de fluido sinovial que logró ser retenida en la columna de intercambio aniónico logró ser separada parcialmente como se observa en la figura 4A. Entre 7 y 9 picos fueron observados, los cuales no representan proteínas puras por sí solos en su mayoría, sino que una mezcla de estas (fracciones 4-7). Es así, que en las fracciones 4 y 5 se logra apreciar la mayor concentración proteica, observando la aparición de la albúmina residual que no pudo ser eliminada a través de la columna de afinidad. Por otro lado, las fracciones 8 y 9 lograron ser separadas casi en su totalidad, observando proteínas de 50 y 20 kDa respectivamente. Aunque se observó la presencia de dos picos definidos en el cromatograma de la corrida de intercambio aniónico, no se logró detectar la presencia de proteínas a través de un gel de poliacrilamida en la fracción 10 y de ninguno de los fluidos sinoviales utilizados, fenómeno que se corroboró mediante la cuantificación de las proteínas por BCA. Esto indica que ambos picos contenían una cantidad muy pequeña de proteína o que en estas fracciones se encontraban péptidos que no se lograron observar debido a límites de detección de las técnicas utilizadas para evaluar la presencia proteica. Debido a problemas con la capacidad máxima de

proteínas capaz de ser retenida por la columna y a la cantidad de proteína requerida para realizar ensayos funcionales posteriores, no se pudo alcanzar una mejor pureza para una caracterización más adecuada de las fracciones que eluyeron a tiempos cercanos al cambio de buffer. No se examinó la separación de proteínas de un tamaño mayor a 250 kDa a través de geles de poliacrilamida y no se descarta que exista una separación de péptidos correspondientes a proteínas degradadas en función a su punto isoelectrico, lo que habría sido interesante estudiar debido a su alto potencial auto-antigenico asociado a la AR.

## **8.2 Respuesta proliferativa de PBMC en respuesta a la estimulación con fluido sinovial**

Para observar la respuesta de PBMC de pacientes o donantes sanos a distintos estímulos antigenicos, se pulsaron con 200 µg/mL de fluidos sinoviales provenientes de pacientes con AR u OA. Luego de tres días de estimulación, se logró observar que existía una proliferación basal de los linfocitos del PBMC no estimulado, lo que probablemente se debe a la manipulación durante su proceso de descongelamiento (Figura 6A, dot plot parental). A pesar de esta proliferación basal, se logró ver un efecto característico según el fluido sinovial que se utilizó como estímulo. Cuando se estimularon células de pacientes o donantes sanos con fluido sinovial provenientes de donantes con OA, la proliferación de los linfocitos T CD4+ positivos disminuyó en comparación al PBMC sin estimular (Figura 6). Este fenómeno pudo haber ocurrido debido a una posible presencia de citoquinas anti-inflamatorias en este tipo de fluido, como TGF-β, lo que concuerda con lo expuesto en trabajos realizados previamente (Lestejo, 1998). Otra posible causa de este fenómeno, es que el fluido de pacientes con OA presente factores que favorezcan la apoptosis o anergia linfocitaria.

Por otro lado, cuando el PBMC fue estimulado con fluido sinovial de pacientes con AR, se observó una leve respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+, la cual alcanzó significancia estadística en el caso del PBMC de pacientes con AR en comparación a la estimulación de fluido sinovial de pacientes con OA, pero no en donantes sanos. Sin embargo, se observa una marcada tendencia entre ambas condiciones en este último caso. Diversos trabajos que estudian la proliferación de células T en respuesta a antígenos específicos consideran un valor de corte de 2, sobre el índice de proliferación para considerar una respuesta positiva (Aggarwal y col., 2013, von Delwig y col., 2010). En el caso de la proliferación linfocitaria en respuesta al fluido sinovial de pacientes con AR este valor no se alcanzó, por lo que es probable que si existen antígenos inmunodominantes en este tejido, estos se encuentran pobremente representados y su concentración no fue la suficiente para estimular a clones auto-reactivos en PBMC de pacientes con AR incluso cuando la concentración del fluido sinovial fue exagerada para suplir esta carencia proteica (200 µg/mL de fluido en comparación a los 5 µg/ml que se utilizan normalmente en ensayos de proliferación antígeno específica).

Otro de los inconvenientes del ensayo celular realizado tiene que ver con el pobre control de las condiciones del microambiente celular. El PBMC está compuesto por distintos tipos de células mononucleares y la secreción de señales moleculares que pudieran estar interfiriendo con la proliferación linfocitaria por parte de otros tipos celulares no puede ser descartada. Cuando el PBMC fue estimulado con 5 µg/mL de las fracciones de fluido sinovial ya purificadas no se observó una proliferación específica. Estos resultados hacen descartar la teoría de que una baja concentración antigénica era la responsable de la hipo respuesta linfocitaria e inclina la balanza a la

probabilidad de que otros tipos de células mononucleares estuvieran afectando a la proliferación celular. Finalmente, no se puede descartar de que debido a la frecuencia de linfocitos T CD4+ (~10% del PBMC) no existieran clones auto-reactivos contra los antígenos probados.

### **8.3 Maduración de células dendríticas con MPLA y capacidad de procesamiento antigénico.**

Con el fin de controlar de mejor manera las variables presentes en un experimento *in vitro* de proliferación en respuesta a posibles antígenos presentes en el fluido sinovial de pacientes con AR se decidió utilizar como aproximación una reacción leucocitaria mixta. El protocolo utilizado para la generación de DCs a partir de sangre periférica humana de pacientes con AR o donantes sanos ha sido descrito y utilizado previamente por el grupo de trabajo (García-González y *col.*, 2013) y se ha demostrado que DCs maduras con MPLA producen altas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, expresan altos niveles de moléculas de co-estimulación como CD40, CD80 y CD86 e inducen una alta proliferación en linfocitos T CD4+ *in vitro* tanto en reacciones alogénicas como autólogas mediadas por antígeno. Es por esta razón que se decidió utilizar este tipo de DCs en contraposición a DCs sin tratar para la realización de los ensayos funcionales *in vitro* a pesar de que los niveles de MHC-II sean similares en ambos tipos celulares. A pesar de que existan trabajos que aseveren que la presentación antigénica está favorecida en DCs maduras con LPS o MPLA según su expresión de MHC-II con respecto a su contraparte sin tratar, esos resultados no pudieron ser comprobados en este seminario de título. Sin embargo, al observar morfológicamente los distintos tratamientos de DCs, se evidencia que la maduración con MPLA propicia un cambio en la estructura citoplasmática celular. Al madurar, las

DCs desarrollan prolongaciones que podrían favorecer la presentación antigénica a linfocitos T CD4+ debido a un aumento en la superficie celular y por consiguiente la probabilidad de contacto con el linfocito.

La evaluación de la expresión de MHC-II y morfología celular sólo se evaluó en células de pacientes con AR debido a que son las que se utilizarían para los ensayos de reacción leucocitaria mixta, aunque no se han reportado cambios considerables con relación a su perfil fenotípico en comparación con DCs de donantes sanos (Harry y *col.*, 2010). Por último, se midió la capacidad endocítica de las DCs para estandarizar el proceso de estimulación antigénica. Según la literatura, las DCs tienen una menor capacidad endocítica cuando maduran en el organismo al tener contacto con un patógeno. Este mecanismo permite que la DC migre rápidamente a los órganos linfoides secundarios y presente antígenos de una sola fuente a linfocitos T CD4+ residentes en éstos. De esta manera la respuesta generada es eficiente y rápida. Es por este motivo que el pulso antigénico se realizó previo a la maduración con MPLA, pero era de importancia reconocer si existía un tiempo óptimo en el cual las DCs logran endocitar una cantidad considerable de antígeno. Mediante la incorporación de Dextran-FITC, una molécula de gran tamaño molecular, se logró evidenciar un aumento en la endocitosis a 37°C a medida que transcurría el tiempo. Se escogió el tiempo de 2 horas para la estimulación antigénica con fracciones de fluido sinovial para los futuros ensayos funcionales.



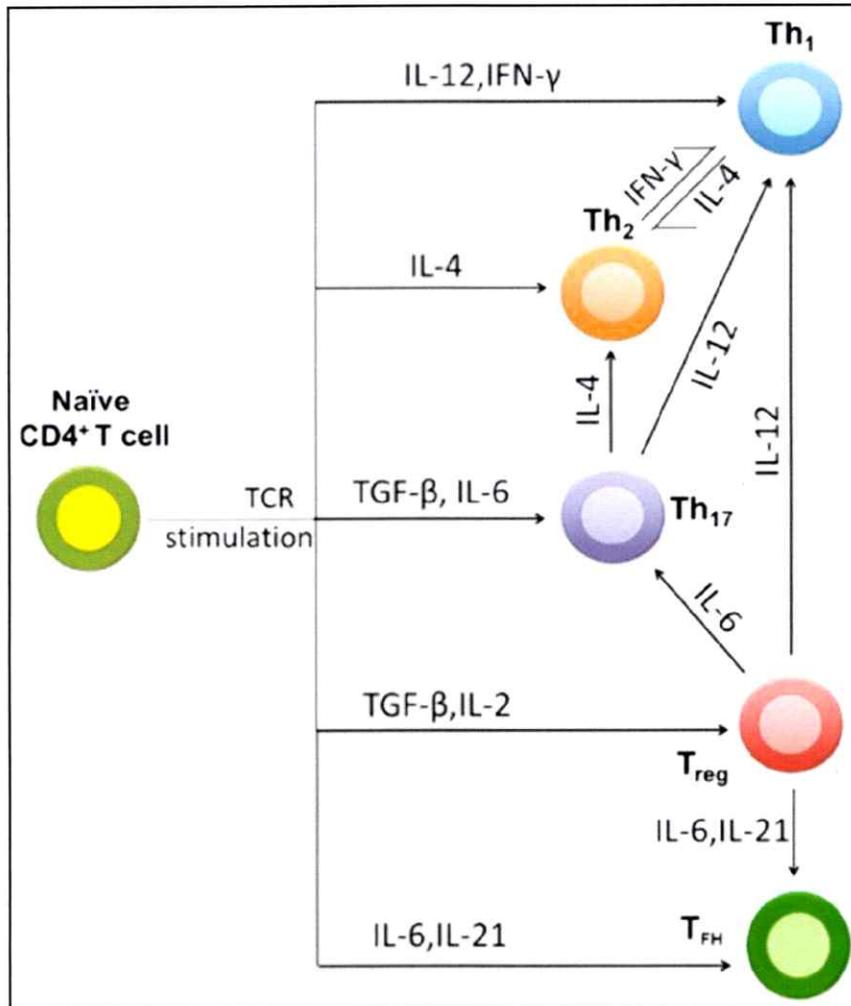
#### **8.4 Respuesta antígeno-específica a proteínas de presentes en el fluido sinovial de pacientes con AR.**

Para determinar la presencia de posibles autoantígenos en el FS de pacientes con AR con la finalidad de utilizarlo como una fuente de péptidos para la carga de tolDCs, se midió su capacidad de proliferar, producir IFN- $\gamma$  e IL-17A en ensayos de co-cultivos autólogos con DCs maduras estimuladas con MPLA. La decisión de utilizar DCs maduras para observar los resultados de la estimulación en contraposición a tolDCs está dada principalmente debido a que la respuesta de los linfocitos a las primeras sería cuantificable de una manera más evidente, ya que la estimulación con este tipo celular es considerablemente más fuerte. Este fenómeno se debe principalmente a la gran capacidad de las mDCs de secretar citoquinas pro-inflamatorias y de expresar altos niveles de MHC-II y moléculas de co-estimulación.

Los niveles de proliferación basal de los linfocitos T CD4+, luego de ser descongelados, es baja en comparación a los linfocitos expuestos a mDCs que no fueron pulsados con ningún péptido. Esto puede indicar que las DCs generadas poseen la capacidad de endocitar restos de matriz celular que encuentran durante el transcurso del cultivo, procesarlos y presentarlos a los linfocitos, entre los cuales algunos de los clones reaccionan y montan una respuesta. Sin embargo, los niveles de producción de citoquinas son similares, por lo que esta leve estimulación no logró producir la diferenciación a los perfiles inflamatorios Th1 y Th17 en las células proliferantes (Figura 9A y 10A, cuadrante superior izquierdo). Estos resultados no fueron observados probablemente debido al tiempo de incubación del cultivo, ya que los ciclos de proliferación no se logran observar claramente en este caso.

De modo de observar la respuesta proliferativa y de producción de citoquinas de una manera potente, los linfocitos fueron estimulados en ausencia de DCs con anti-CD3. Se ha reportado que una estimulación potente del TCR de manera policlonal induce una alta respuesta inflamatoria del tipo Th1. Sin embargo, durante el desarrollo de este seminario, también se logró observar una expansión de linfocitos Th17 en respuesta a este tipo de estímulo. La probabilidad de que este tipo de linfocitos sea positivo para ambos tipos de citoquinas es muy baja, debido a la regulación negativa que ejerce cada subtipo de linfocito sobre el otro y a que se le ha otorgado una función reguladora a la escasa población en un estado de semi-diferenciación Th17-Th1 debido a la acción de IL-12 (Gesham Magombedze, 2013). Cuando se pulsaron las MPLA-DCs con distintas fracciones del fluido sinovial de pacientes con AR, no se observó una proliferación diferencial debido a los distintos tratamientos y en todos los casos la proliferación no superó a la alcanzada en el ensayo con las células sin cargar incluso cuando se incluyó como control PPD. La población chilena es vacunada contra la tuberculosis, por lo que se esperaba una respuesta exacerbada a este derivado proteico. Sin embargo, los linfocitos de pacientes con AR no parecen reaccionar contra el antígeno probablemente debido a un enmascaramiento de la señal en respuesta al microambiente altamente inflamatorio que se está creando en el cultivo *in vitro* o a que la estimulación por parte de MPLA-DCs es demasiado alta, por lo que quizás utilizar una variedad de DC no madura habría proporcionado un sistema más sensible para lograr observar respuestas diferenciales discretas. Por otro lado, cuando se midió la producción de IFN- $\gamma$  en los experimentos en los que se estimuló a las DCs con fracciones de fluido sinovial, los linfocitos tanto no proliferantes como proliferantes secretaron mayores cantidades de esta citoquina en comparación a los experimentos en que no se pulsaron las DCs, aunque ese aumento no haya alcanzado significancia

estadística. La mayor producción de IFN- $\gamma$  se alcanzó cuando las DCs fueron pulsadas con la fracción 8 de ambos fluidos sinoviales, lo que podría indicar que esta fracción tiene una composición similar en ambas muestras. Aunque se observó una leve producción diferencial no significativa de IFN- $\gamma$  en respuesta a los distintos estímulos antigénicos, ésta no se correlaciona con la respuesta proliferativa de linfocitos. Este fenómeno puede deberse a un proceso de plasticidad celular, en el que los linfocitos, diferenciados o no, adquieren características de otro subtipo linfocitario (Figura 9) y no a una plasticidad poblacional, en la que se favorece la expansión de un subtipo específico de linfocitos T y una anergia a apoptosis de los otros subtipos (Magombedze y col, 2013).



**Figura 12 Plasticidad celular de linfocitos T CD4+.** Los linfocitos T CD4+ pueden cambiar desde su estado diferenciado hacia otros subtipos linfocitarios gracias a la acción de combinaciones de distintas citoquinas producidas por las células presentadoras de antígenos. Imagen modificada de Magombedze y col. 2013.

Esta teoría se vería respaldada por la capacidad de las DCs maduras de secretar altos niveles de IL-12 (García-González y col. 2013). Sin embargo, no se puede aseverar que este sea el caso, ya que las diferencias observadas no alcanzaron significancia estadística con el N alcanzado en los experimentos.

Al analizar la secreción de IL-17A en respuesta a la estimulación antigénica no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Es interesante notar que la proporción de linfocitos T CD4+ para esta citoquina es menor que la proporción de linfocitos T IFN- $\gamma$ +. Es importante recalcar, que a pesar de no observar diferencias significativas entre los tratamientos, la fracción 6 de ambos fluidos sinoviales probados propició un aumento en la producción de IL-17A en todas las muestras de pacientes con AR, lo que daría evidencia de composiciones proteicas similares en ambos casos. Estos resultados, coinciden con que esta fracción es la que produjo la menor cantidad de IFN- $\gamma$  por los linfocitos, concordante con la capacidad que tiene ROR $\gamma$ -T de apagar la respuesta del tipo Th1. Además, esta fracción sería interesante en el contexto de la enfermedad en pacientes, debido a que la AR está controlada por el perfil inflamatorio Th17.

Finalmente, para medir si las señales observadas eran antígeno-específicas, se utilizó un anticuerpo anti-MHC-II, capaz de bloquear la presentación antigénica. Es de esta manera que se logró corroborar que la proliferación observada no era antígeno específica, ya que no disminuía cuando se trató el co-cultivo con el bloqueador de MHC-II. Sin embargo, la producción de IFN- $\gamma$  sí disminuyó considerablemente en todas las fracciones probadas y la producción de IL-17A disminuyó levemente, indicando un componente basal de su producción por parte de los linfocitos de pacientes con AR. Además, esta pequeña disminución no pudo ser revertida por el isotipo del anticuerpo.

## 8.5 Proyecciones

A pesar de no haber observado diferencias significativas en respuesta a la estimulación con antígenos de fluido sinovial, se logró evidenciar ciertas tendencias que harían pensar que mejorando algunas variables de los ensayos, como utilizar ST-DCs o tolDCs se podrían observar diferencias más sutiles en cuanto a la proliferación entre distintas fracciones de fluido sinovial. Por otro lado, sería interesante averiguar qué proteínas están contenidas en las fracciones 6 y 8 del fluido sinovial mediante espectrometría de masa acoplada a la separación por intercambio aniónico como ya se ha sido realizado en trabajos previos, pero esta vez con fines de encontrar proteínas funcionales para una posible terapia celular (Kamphorst *y col.*, 2007). Una vez dilucidada la composición de cada fracción, sintetizar las proteínas ahí encontradas y probarlas en un sistema similar para observar su capacidad antigénica. De esta manera se podrían refinar las condiciones cromatográficas si se conocen las características físico-químicas de la proteína en cuestión por lo que no se tendría que recurrir a técnicas que encarecerían una obtención antigénica como lo es la síntesis proteica a través de la generación de proteínas recombinantes. De esta manera, uno de los pasos limitantes para la generación de terapias celulares en contra de la AR podría verse resuelta, ya que la búsqueda del antígeno adecuado y que pueda ser purificado o sintetizado a bajos costos para la estimulación de DCs ha sido un tema de discusión desde que se las propuso como una terapia curativa para la enfermedad.

Bajo este contexto, y debido a que no es factible trasladar este protocolo a ensayos con modelos animales, sería importante realizar estudios clínicos para evaluar la capacidad para mejorar la enfermedad por parte de las tolDCs generadas a partir del protocolo descrito por García-González y pulsadas con los antígenos aquí encontrados

y obtenidos en condiciones GMP. De esta manera, se podría elucidar los mecanismos por los cuales las DCs actuarían *in vivo*, contexto en el que la inflamación podría interferir con el funcionamiento observado en las pruebas *in vitro* y afectar su estabilidad.

## 9. CONCLUSIONES

- Es posible separar el fluido sinovial de pacientes con AR en al menos once picos proteicos mediante cromatografía de intercambio aniónico con las condiciones utilizadas.
- Tanto el FS de pacientes con AR como el de pacientes con OA son pobres estimuladores de la respuesta proliferativa de linfocitos T CD4+ en PBMC de pacientes con AR como de controles sanos. Sin embargo, se observa que el primer FS tiene una mayor capacidad de estimular los linfocitos T CD4+ de pacientes que el FS de controles con OA, no así los de donantes sanos.
- Las fracciones proteicas obtenidas mediante cromatografía de intercambio aniónico no indujeron proliferación diferencial es linfocitos T CD4+ en PBMC de pacientes con AR.
- Algunas de las fracciones proteicas obtenidas mediante cromatografía de intercambio aniónico son capaces de inducir la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17 en linfocitos T CD4+ totales de pacientes con AR. Sin embargo, las diferencias observadas en la producción de citoquinas no varían significativamente entre los distintos tratamientos.

## 10. REFERENCIAS

- Aggarwal, A., Srivastava, R. & Agrawal, S. (2013). T cell responses to citrullinated self-peptides in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A., Funovits, J., Felson, D., Bingham, C., Birnbaum, N., Burmester, G., Bykerk, V., Cohen, M., Combe, B., Costenbader, K., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J., Hobbs, K., Huizinga, T., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T., Laing, T., Mease, P., Ménard, H., Moreland, L., Naden, R., Pincus, T., Smolen, J., Stanislawska-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P., Upchurch, K., Vencovsky, J., Wolfe, F. & Hawker, G. (2010). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 1580-1588.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. & von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nature immunology* 3, 756-763.
- Ashkar, S. (2000). Eta-1 (Osteopontin): An Early Component of Type-1 (Cell-Mediated) Immunity. *Science*.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A. & Trinchieri, G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *The Journal of experimental medicine* 201, 1157-1167.
- Begovich, A., Carlton, V., Honigberg, L., Schrodi, S., Chokkalingam, A., Alexander, H., Ardlie, K., Huang, Q., Smith, A., Spoerke, J., Conn, M., Chang, M., Chang, S.-Y. P., Saiki, R., Catanese, J., Leong, D., Garcia, V., McAllister, L., Jeffery, D., Lee, A., Batliwalla, F., Remmers, E., Criswell, L., Seldin, M., Kastner, D., Amos, C., Sninsky, J. & Gregersen, P. (2004). A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American journal of human genetics* 75, 330-337.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I. & Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of experimental medicine* 180, 1263-1272.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886.
- Echan, L. A., Tang, H.-Y. Y., Ali-Khan, N., Lee, K. & Speicher, D. W. (2005). Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 5, 3292-3303.
- Edwards, J. C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D. R., Stevens, R. M. & Shaw, T. (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 350, 2572-2581.
- Eggleton, P., Haigh, R. & Winyard, P. G. (2008). Consequence of neo-antigenicity of the 'altered self'. *Rheumatology (Oxford, England)* 47, 567-571.
- Firestein, G. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361.
- García-González, P., Morales, R., Hoyos, L., Maggi, J., Campos, J., Pesce, B., Gárate, D., Larrondo, M., González, R., Soto, L., Ramos, V., Tobar, P., Molina, M., Pino-Lagos, K., Catalán, D. & Aguillón, J. (2013). A short protocol using dexamethasone and monophosphoryl lipid A

generates tolerogenic dendritic cells that display a potent migratory capacity to lymphoid chemokines. *Journal of translational medicine* **11**, 128.

Gesham Magomedze, P. B. J. R., Shigetoshi Eda, Vitaly V Ganusov (2013). Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. *Frontiers in physiology* **4**, 206.

Giorgio, T., Stefan, P. & Robert, A. K. (2003). The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. *Immunity*.

Gisbergen, v. (2005). Molecular mechanisms that set the stage for DC-T cell engagement. *Immunology Letters* **97**, 199208.

Gregersen, P., Silver, J. & Winchester, R. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **30**, 1205-1213.

Hain, N. A., Stuhlmüller, B. & Hahn..., G. R. (1996). Biochemical characterization and microsequencing of a 205-kDa synovial protein stimulatory for T cells and reactive with rheumatoid factor containing sera. *The Journal of ...*

Harry, R. A., Anderson, A. E., Isaacs, J. D. & Hilkens, C. M. (2010). Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **69**, 2042-2050.

Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R., Romani, N. & Schuler, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *European journal of immunology* **26**, 659-668.

Hill, J., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A., Bell, D. & Cairns, E. (2003). Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**, 538-541.

Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* **5**, 987-995.

Jin, H., Arase, N., Hirayasu, K., Kohyama, M., Suenaga, T., Saito, F., Tanimura, K., Matsuoka, S., Ebina, K., Shi, K., Toyama-Sorimachi, N., Yasuda, S., Horita, T., Hiwa, R., Takasugi, K., Ohmura, K., Yoshikawa, H., Saito, T., Atsumi, T., Sasazuki, T., Katayama, I., Lanier, L. L. & Arase, H. (2014). Autoantibodies to IgG/HLA class II complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 3787-3792.

Kamphorst, J., van der Heijden, R., DeGroot, J., Lafeber, F., Reijmers, T., van El, B., Tjaden, U., van der Greef, J. & Hankemeier, T. (2007). Profiling of endogenous peptides in human synovial fluid by NanoLC-MS: method validation and peptide identification. *Journal of proteome research* **6**, 4388-4396.

Kinloch, A., Tatzer, V., Wait, R., Peston, D., Lundberg, K., Donatien, P., Moyes, D., Taylor, P. C. & Venables, P. J. (2004). Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* **7**, 9.

Klareskog, L., Forsum, U., Scheynius, A., Kabelitz, D. & Wigzell, H. (1982). Evidence in support of a self-perpetuating HLA-DR-dependent delayed-type cell reaction in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 3632-3636.

- Lazarevic, V., Chen, X., Shim, J.-H. H., Hwang, E.-S. S., Jang, E., Bolm, A. N., Oukka, M., Kuchroo, V. K. & Glimcher, L. H. (2010). T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR $\gamma$ t. *Nature immunology* **12**, 96-104.
- Lee, H.-S., Irigoyen, P., Kern, M., Lee, A., Batliwalla, F., Khalili, H., Wolfe, F., Lum, R., Massarotti, E., Weisman, M., Bombardier, C., Karlson, E., Criswell, L., Vlietinck, R. & Gregersen, P. (2007). Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis and Rheumatism* **56**, 1745-1753.
- Lestejo, N., Strom, Nilsson, Glinghammar, Dahlstedt and Moller (1998). Synovial Fluid Cytokines in Patients with Rheumatoid Arthritis or Other Arthritic Lesions. *Scandinavian Journal of Immunology* **48**, 286-292.
- Li, M. O., Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. (2007). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* **26**, 579-591.
- Löfdahl, J., Wahlström, J. & Sköld, C. (2006). Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers. *Clinical and experimental immunology* **145**, 428-437.
- Lugo-Villarino, G., Maldonado-Lopez, R., Possemato, R., Penaranda, C. & Glimcher, L. H. (2003). T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7749-7754.
- MacGregor, A., Snieder, H., Rigby, A., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K. & Silman, A. (2000). Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis and Rheumatism* **43**, 30-37.
- Makrygiannakis, D., af Klint, E., Lundberg, I., Löfberg, R., Ulfgren, A. K., Klareskog, L. & Catrina, A. (2006). Citrullination is an inflammation-dependent process. *Annals of the rheumatic diseases* **65**, 1219-1222.
- Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A. K., Nicholas, A., Zendman, A., Eklund, A., Grunewald, J., Skold, C., Klareskog, L. & Catrina, A. (2008). Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the rheumatic diseases* **67**, 1488-1492.
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R. & Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-234.
- Mark, H. K., Ulrike, S., Stephen, T. S. & Michael, J. G. (1996). Stat6 Is Required for Mediating Responses to IL-4 and for the Development of Th2 Cells. *Immunity*.
- Masson-Bessière, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhausser, E., Nogueira, L., Vincent, C., Senshu, T. & Serre, G. (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 4177-4184.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. (2012). 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**, 563-604.
- Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T. & Voehringer, D. (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**, 549-559.

- Padyukov, L., Silva, C., Stolt, P., Alfredsson, L. & Klareskog, L. (2004). A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **50**, 3085-3092.
- Pratesi, F., Tommasi, C., Anzilotti, C., Chimenti, D. & Migliorini, P. (2006). Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **54**, 733-741.
- Pulendran, B., Palucka, K. & Banchereau, J. (2001). Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science (New York, N.Y.)* **293**, 253-256.
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L. & Sisirak, V. (2010). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology* **29**, 163-183.
- Sebbag, M., Moinard, N., Auger, I., Clavel, C., Arnaud, J., Nogueira, L., Roudier, J. & Serre, G. (2006). Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *European journal of immunology* **36**, 2250-2263.
- Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. (2002). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* **21**, 685-711.
- Suzuki, A., Yamada, R., Ohtake-Yamanaka, M., Okazaki, Y., Sawada, T. & Yamamoto, K. (2005). Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochemical and biophysical research communications* **333**, 418-426.
- Symmons, D., Bankhead, C., Harrison, B., Brennan, P., Barrett, E., Scott, D. & Silman, A. (1997). Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis and Rheumatism* **40**, 1955-1961.
- Tang, H. & Cyster, J. (1999). Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 819-822.
- Trinchieri, G. & Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews. Immunology* **7**, 179-190.
- Trombetta, E. & Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual review of immunology* **23**, 975-1028.
- Turell, L., Botti, H., Bonilla, L., Torres, M. J., Schopfer, F., Freeman, B. A., Armas, L., Ricciardi, A., Alvarez, B. & Radi, R. (2013). HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **944**, 144-151.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J., Pascual, V., Palucka, A. & Banchereau, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological reviews* **219**, 118-142.
- van Hamburg, J., Asmawidjaja, P., Davelaar, N., Mus, A., Colin, E., Hazes, J., Dolhain, R. & Lubberts, E. (2011). Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis and Rheumatism* **63**, 73-83.
- van Vliet, S. J., den Dunnen, J., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. (2007). Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Current opinion in immunology* **19**, 435-440.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189.

- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S. I., Hupé, P., Barillot, E. & Soumelis, V. (2008). A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nature immunology* **9**, 650-657.
- von Delwig, A., Locke, J., Robinson, J. & Ng, W.-F. (2010). Response of Th17 cells to a citrullinated arthritogenic aggrecan peptide in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* **62**, 143-149.
- Warnock, M. G. & Goodacre, J. A. (1997). Cryptic T-cell epitopes and their role in the pathogenesis of autoimmune diseases. *British journal of rheumatology* **36**, 1144-1150.
- Wilke, C. M., Bishop, K., Fox, D. & Zou, W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends in immunology* **32**, 603-611.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S. & Sakaguchi, S. (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *International immunology* **16**, 1643-1656.
- Zhu, J., Guo, L., Watson, C. J., Hu-Li, J. & Paul, W. E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *The Journal of Immunology* **166**, 7276-7281.
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. & Paul, W. E. (2005). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell research* **16**, 3-10.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y.-J. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M. & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, 80.