

UCH-FC
Biotecnología
F 391
C.1



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Pregrado



**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 Y DE LA EXPRESIÓN DE
FcγRIIb EN LINFOCITOS B DE PACIENTES CON ESCLEROSIS
SISTÉMICA”**

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

ASHLEY ANDRÉS FERRIER ESPÓSITO

Director de Seminario de Título:
Dr. Diego Catalán Martina

Co-director de Seminario de Título:
Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez

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

Mayo 2016
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

ASHLEY ANDRÉS FERRIER ESPÓSITO

“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 Y DE LA EXPRESIÓN DE FcγRIIb EN LINFOCITOS B DE PACIENTES CON ESCLEROSIS SISTÉMICA”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Diego Catalán Martina
Director Seminario de Título

Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez
Co-Director Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Prof. Patrocinante del Seminario

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Daniela Sauma Mahaluf
Presidente

Dr. Juan Fernández Hidalgo
Evaluador

This block contains handwritten signatures in blue ink. The first signature is 'Jans Bong' and the second is 'Daniela Sauma'. There are two circular official stamps: one from the 'FACULTAD DE CIENCIAS U. DE CHILE' and another from the 'BIBLIOTECA CENTRAL U. DE CHILE'.

Santiago de Chile, Mayo de 2016

La ciencia no es solo una disciplina de razón, sino también de romance y pasión.

Biografía

Nacido un 20 de Noviembre de 1989 en las campestres tierras de San Fernando, segundo y último hijo de unos padres dedicados a la crianza y buena educación de sus “niños”. Crecí dentro de una familia de muchos primos, en donde juntarse a jugar con tierra, cajas de cartón o a la tiña en el enorme jardín de mis abuelos era lo mejor que nos podía pasar en el día. Aunque no lo recuerdo supongo que se notaba mi interés por la ciencia y la curiosidad por saber dado que recibí juegos de química y microscopios en mis regalos de niñez.



Pasé mis primeros años en el jardín de mi casa en la población Centinela, para luego ingresar al Instituto San Fernando de la Congregación Marista, un colegio de curas en donde se rezaba todos los días con ángelus incluido. La educación ahí fue de las mejores que se podía optar en el pueblo, con profesores pulentos y con mucha dedicación a sus alumnos. Pase toda mi enseñanza básica y media en estas instalaciones de donde adquirí conocimiento, buenos recuerdos y grandes amistades.

Ya en tercero medio nos preparaban para la famosa prueba de selección universitaria, y nos hacían test de vocación periódicamente y nos citaban con la orientadora. Siempre fui un ñoño biólogo-matemático, y quería una carrera que dentro del proceso universitario me ayudara a aclarar mejor el área a seguir. Así fue que descubrí esta carrera, que nadie conocía en mi colegio, ni en mis cercanos. Recibí constantes intentos de modificar mi elección por parte de la orientadora, instándome a estudiar medicina

como lo hacía ya mi hermano o Ing. Civil, pero yo ya tenía la decisión tomada, preparé la prueba con puros facsímiles, evitando siempre los de Lenguaje.

El puntaje me alcanzó y me vine a la capital a estudiar esta hermosa y multidisciplinaria carrera, en donde seguí descubriendo lo maravilloso de la ciencia, el método experimental, y en cómo podemos aplicar nuestro conocimiento para generar un bien a la sociedad. Con el camino noté que la Biomedicina era el área de la ciencia que me atraía y que sentía que era en la que me podía desenvolver de mejor manera. Se me dio la oportunidad de desarrollar mi Seminario de Título en el Laboratorio de Inmunoregulación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, con un equipo de trabajo de excelencia y un grupo humano difícil de igualar. Fue aquí donde terminé de confirmar que esto era lo mío, aunque a veces mis cercanos no lo entienden, me encanta pasar horas y horas en cultivo para saber si la hipótesis se cumple, o qué se puede mejorar para optimizar los resultados.

Ahora estoy a las puertas de conseguir mi título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, con expectación espero las oportunidades que se presentarán en el camino para poder seguir creciendo como científico y desarrollando y aportando en el conocimiento para las futuras generaciones.

Agradecimientos

Son bastantes personas las que me han acompañado en este camino, habiendo 2 procesos importantes, el desarrollo experimental de mi tesis y los casi 2 años que llevo trabajando como Asistente de Investigación en el Laboratorio de Inmunorregulación.

Quisiera partir por agradecer a mis padres, por dar todo lo que podían y más por mi educación y la entrega de valores, que hasta el día de hoy marcan mi pauta diaria. A mi hermano con que el que llevo más de 8 años viviendo solos en Santiago, y que siempre me ha apoyado y ahora estos últimos años pseudo-manteniendo. A mis abuelos que en paz descansen todos, principalmente a la abuela Yoya, la única que pudo acompañarme unos años durante la carrera.

A los amigos del colegio, particularmente a mis 2 perros, Jalitro y Patokarlo, son pocas las veces que logramos reunirnos los 3 pero cada vez es como si nos hubiésemos visto el día anterior. Gracias cabros por el apoyo incondicional, las coronas y las pistolas.

A los Bistek, un grupo ñoño y distribuido por la facultades de la Universidad, Médicos, Nutris, Abogados, Ingenieros y los Biotecs que se quedaron en el barco. Hemos pasado todos estos años unidos y mambeando con su báltica en mano y, como siempre, en el 207. Defensas, Congresos, Carretes, Vacaciones, Años nuevos, Matrimonios y hasta sobrinillo biotek son parte de los eventos que semana a semana nos congregan. Gracias a todos por su buena onda, sus bromas, sentido del humor y por siempre dejar el baño limpio. Mención especial al Anner, que se encuentra de gira por el mundo pero que todos esperamos este de vuelta para seguir rompiendo records y redes, que la Diosa y la Gloriosa naranja nos mantenga unidos.

Gracias a los integrantes del PDI, a la Nancy por sus PBSs, a la Juany por la ayuda en la toma de muestras y las largas horas conversando mientras esperábamos a los

pacientes en el hospital, a los que fueron y son JCAs por hacer más ameno el trabajo de laboratorio, mención especial a la Jaxi porque van 8 años ya que nos vemos casi todos los días, al IBT por quejarse que nunca les agradecen en las tesis, a la Veriwis por toda la buena onda y preocupación por nosotros, a la Andre que espero que le vaya la cumbia en el Doctorado, también a la Ely y a Jorge por los días que trabajamos codo a codo con las muestras; y a todo el grupo "Asadito Lab" por lo momentos de esparcimiento y de ciencia constructiva.

Gracias al excelente equipo de trabajo que me acogió, a mi tutor el Dr. Diego Catalán y al ahora reciente Dr. Alex., gracias por confiar en mí y mis capacidades y por darme las herramientas, el conocimiento y el motivación para desarrollar este trabajo y ayudar a formarme como profesional. Agradecer a la Dra. Lilian Soto y a sus pacientes, que sin ellos este trabajo no hubiese podido ni comenzar.

Finalmente agradecer al Bullita querido por las alegrías y pesares, por la Copa Sudamericana y los campeonatos que te he visto ganar... más que una pasión, un sentimiento.

Financiamiento

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de "Inmunoregulación" perteneciente al grupo de "Inmunorregulación y Tolerancia" (IRTgroup) del Programa Disciplinario 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 1121100 y 11121497, y del Instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia P09/016-F.

Índice de contenidos

| | |
|--|------|
| Biografía..... | iv |
| Agradecimientos | vi |
| Financiamiento..... | viii |
| Índice de contenidos | ix |
| Índice de tablas..... | xii |
| Índice de figuras..... | xiii |
| Lista de Abreviaturas..... | xv |
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Abstract..... | 3 |
| 3. Introducción | 5 |
| 3.1. La Esclerosis Sistémica (ES) o Escleroderma | 5 |
| 3.2. Inmunopatogénesis de la ES | 6 |
| 3.3. Rol de los linfocitos B en ES | 7 |
| 3.4. Linfocitos B reguladores | 8 |
| 3.5. Linfocitos B reguladores humanos en autoinmunidad | 10 |
| 3.6. Receptores Fcy en linfocitos B..... | 11 |
| 3.7. El receptor FcγIIb en autoinmunidad..... | 12 |
| 4. Hipótesis | 14 |
| 5. Objetivo General | 15 |
| 5.1. Objetivos Específicos..... | 15 |
| 6. Materiales y Métodos | 16 |
| 6.1. Reclutamiento y caracterización clínica de pacientes con ES. | 16 |

| | |
|---|----|
| 6.2. Extracción de linfocitos B y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con ES..... | 18 |
| 6.3. Extracción de linfocitos B y de células PBMC de controles sanos..... | 19 |
| 6.4. Evaluación del efecto de la activación de FcγRIIb sobre la producción y secreción de IL-10 inducida por la activación del BCR..... | 19 |
| 6.5. Evaluación del efecto de la señalización de FcγRIIb sobre la fosforilación de Akt vía activación del BCR..... | 20 |
| 6.6. Evaluación en la producción y secreción de IL-10 en linfocitos B de pacientes y de donantes sanos..... | 21 |
| 6.7. Citometría de Flujo..... | 22 |
| 6.8. Cuantificación de IL-10 por ELISA..... | 24 |
| 6.9. Análisis estadísticos..... | 24 |
| 7. Resultados..... | 26 |
| 7.1. Definición de las subpoblaciones de linfocitos B de sangre periférica..... | 26 |
| 7.2. Comparación en la frecuencia de linfocitos B y de sus subpoblaciones en sangre periférica entre controles sanos y pacientes con ES. | 27 |
| 7.3. Inducción de la producción y secreción de IL-10 en linfocitos B..... | 30 |
| 7.4. Capacidad de los linfocitos B de pacientes con ES de producir y secretar IL-10.. | 32 |
| 7.5. Expresión de FcγRIIb en linfocitos B de pacientes con ES y de controles sanos. | 34 |
| 7.6. Activación del receptor FcγRIIb..... | 35 |
| 7.7. Efecto de la activación del receptor FcγRIIb sobre la producción de IL-10 por linfocitos B..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 7.8. Comparación de la función de FcγRIIb en linfocitos B de pacientes con ES y controles sanos..... | 38 |
| 7.9. Asociación entre la frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B y la severidad de la ES..... | 41 |
| 7.10. Asociación entre los niveles expresión de FcγRIIb en las subpoblaciones de linfocitos B y la severidad de la ES..... | 42 |
| 7.11. Asociación entre la capacidad de los linfocitos B de pacientes con ES de secretar IL-10 y la severidad de la enfermedad..... | 43 |
| 8. Discusión | 44 |
| 9. Conclusiones | 49 |
| 10. Bibliografía | 50 |
| 11. Anexo | 56 |

Índice de tablas

Tabla I. Características clínicas de los pacientes y controles reclutados..... 17

Índice de figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Esquema de estímulos utilizados para activar linfocitos B. | 22 |
| Figura 2. Estrategia de selección de subpoblaciones de linfocitos B desde sangre periférica. | 27 |
| Figura 3. Frecuencia de la población de linfocitos B y de sus subpoblaciones en pacientes con ES y en controles sanos. | 29 |
| Figura 4. Niveles de secreción y producción de IL-10 en linfocitos B purificados de sangre periférica. | 31 |
| Figura 5. Niveles de secreción y producción de IL-10 en linfocitos B de pacientes con ES y en controles sanos. | 33 |
| Figura 6. Niveles de expresión de FcγRIIb en linfocitos B de pacientes con ES y en controles sanos. | 35 |
| Figura 8. Efecto de la activación de FcγRIIb en la secreción y producción de IL- 10 en linfocitos B purificados de sangre periférica. | 38 |
| Figura 9. Inhibición en la secreción y producción de IL-10 mediada por fragmentos Fc agregados en linfocitos B de pacientes con ES y en controles sanos. | 39 |
| Figura 10. Inhibición en la producción de IL-10 mediada por fragmentos Fc agregados en la subpoblaciones de linfocitos B de pacientes con ES y en controles sanos. | 39 |
| Figura 11. Índice de inhibición calculado para cada subpoblación de linfocitos B. | 41 |
| Figura 12. Asociación entre las subpoblaciones de linfocitos B y la severidad de la enfermedad. | 41 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 13. Correlaciones entre la expresión de FcγRIIb en las subpoblaciones de linfocitos B y la severidad de la enfermedad..... | 42 |
| Figura 14. Asociación entre la capacidad de los linfocitos B de pacientes con ES de secretar IL-10 y el tipo de ES manifestada..... | 43 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------------|--|
| 3AC | 3- α -aminocolestano |
| ANOVA | Análisis de varianza. |
| APC | Inglés para "Allophycocyanin" |
| BAFF | Factor activador de linfocitos B |
| BCR | Receptor de células B |
| BNP | Péptido Natriuretico Cerebral |
| Bregs | Linfocitos B reguladores |
| CIA | Artritis inducida por colágeno. |
| DLCO | Capacidad de difusión de monóxido de carbono. |
| EAE | Encefalomielitis autoinmune experimental. |
| ELISA | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima. |
| ES | Esclerosis Sistémica |
| ESd | Esclerosis Sistémica difusa |
| ESI | Esclerosis Sistémica limitada |
| FACS | Inglés para "Fluorescence-activated cell sorting". |
| Fc | Fracción Cristalizable |
| FcR | Receptor de Fc |
| FITC | Inglés para "Fluorescein isothiocyanate". |
| FSC | Inglés para "Forward scatter". |
| HAQ | Cuestionario de valoración de la salud. |
| IFN | Interferón. |
| IgD | Inmunoglobulina de isotipo D |
| IgG | Inmunoglobulina de isotipo G |

| | |
|--------------------------------|--|
| IgM | Inmunoglobulina de isotipo M |
| ITIM | Inmunoreceptor basado en tirosina |
| IL | Interleuquina. |
| MEC | Matriz Extracelular |
| MFI | Intensidad de fluorescencia media geométrica. |
| MTX | Metotrexato. |
| NF-κB | Factor nuclear kappa B. |
| PBMC | Células mononucleares de sangre periférica. |
| PBS | Tampón fosfato salino. |
| PE | Inglés para "Phycoerythrin" |
| PMA | Forbol 12-meristato 13-acetato. |
| rh | Proteína humana recombinante. |
| rpm | Revoluciones por minuto. |
| SFB | Suero fetal bovino. |
| SLE | Lupus Eritematoso Sistémico |
| SSC | Inglés para "Side scatter". |
| T2-MZP | Linfocitos B T2 precursores de la zona marginal. |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante beta. |
| Th | Linfocito T "helper" o colaboradores. |
| TLR | Receptor de tipo "Toll". |
| TNF | Factor de necrosis tumoral. |
| Tregs | Linfocitos T reguladores |

1. Resumen

La Esclerosis Sistémica (ES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por una fibrosis extensiva en la piel y en órganos internos. Actualmente la fisiopatología de esta enfermedad permanece desconocida, sin embargo muchos estudios evidencian el rol fundamental que tendría el sistema inmune en la fibrosis celular. Recientemente se le ha asignado un rol importante a los linfocitos B dentro del desarrollo de la ES, esto fundamentado en la gran cantidad de linfocitos B infiltrantes en los órganos afectados por la ES y en la regulación positiva de genes asociados a los linfocitos B en lesiones cutáneas de pacientes con ES. Lo anterior, sumado al gran número de autoanticuerpos asociados a la enfermedad y a la existencia de alteraciones intrínsecas en los linfocitos B de pacientes con ES otorgan evidencia que indicaría la participación de estas células en la patogénesis de la ES. A lo largo de los últimos años ha sido descrita una población de linfocitos B que participa en tolerancia, llamados linfocitos B reguladores (Bregs). Esta población es capaz de secretar IL-10 y de inhibir respuestas T efectoras, y se ha caracterizado por el fenotipo CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi}, correspondiente también a linfocitos B transicionales. Estudios muestran que alteraciones en la frecuencia y función de esta población se asocian a la pérdida de tolerancia inmune. Por otro lado se ha descrito que el receptor inhibitor FcγRIIb, que atenúa la señalización del receptor de antígenos de los linfocitos B (BCR) al unir complejos inmunes, está asociado al desarrollo de enfermedades autoinmunes cuando su expresión o función se ve alterada. En base lo expuesto, el objetivo de este Seminario de Título consistió en el estudio de la frecuencia de subpoblaciones y función de los linfocitos B de pacientes con ES, para contribuir a la comprensión de los mecanismos involucrados en la pérdida de tolerancia inmunológica subyacente a esta enfermedad. Utilizando citometría de flujo, los resultados muestran que los pacientes con ES presentan una alterada frecuencia de las

subpoblaciones de linfocitos B, caracterizada por un aumento en la población transicional y una disminuida población de memoria. Por otro lado, mediante cultivos celulares y pruebas de ELISA se obtuvo que los linfocitos B de pacientes presentan una reducida capacidad de secretar IL-10 en comparación a controles sanos. Además la expresión del receptor FcγIIb en los linfocitos B de pacientes con ES se encuentra aumentada en la subpoblación transicional, alteración que genera una elevada inhibición de la producción de IL-10 en esta subpoblación en presencia de ligandos del receptor FcγIIb. A raíz de los resultados obtenidos se puede sugerir un posible mecanismo mediante el cual los linfocitos B participarían en esta enfermedad, según el cual, los linfocitos B transicionales, al expresar altos niveles del receptor inhibitor FcγIIb, poseerían una disminuida capacidad de secretar IL-10 después de la unión de complejos inmunes conteniendo autoanticuerpos, existiendo así una alteración en un posible ciclo regulador.

2. Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by extensive fibrosis in the skin and internal organs. Currently the physiopathology of this disease remains unknown; however several studies suggest the fundamental role that the immune system could have in cellular fibrosis. Recently an important role has been given to B cells in the development of SSc, based on findings that describe a large number of infiltrating B cells in the organs affected by SSc and an upregulation of genes associated with B cells in skin lesions of patients with SSc. This findings, plus the large number of autoantibodies associated with the disease and the existence of intrinsic abnormalities in the B cells from SSc patients, provides enough evidence to support the involvement of these cells in the pathogenesis of SSc. Over recent years a population of B cells involved in tolerance has been described and called regulatory B cells (Bregs). This population is able to secrete IL-10 and to inhibit the response of effector T cells, and has been characterized by a CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} phenotype, which corresponds to transitional B cells. Recent studies show that changes in the frequency and function of this population are associated with the loss of immune tolerance. Furthermore, it has been described that the inhibitor receptor FcγRIIb, which attenuates the B cell antigen receptor B (BCR) signaling by binding immune complexes, is associated with the development of autoimmune diseases when its expression or function is altered. Based on this background, the objective of this undergraduate thesis was to study the frequency and function of SSc patients B cell subpopulations, in order to contribute to the understanding of the mechanisms involved in the loss of immunological tolerance underlying this disease. Using flow cytometry, the results showed that patients with SSc have an altered frequency of B cells subpopulations, characterized by an increase of the transitional population and a decrease of the memory population. Furthermore, through

cell cultures and ELISA tests, B cells from patients showed a reduced ability to secrete IL-10 compared to healthy controls. In addition, FcγIIb receptor expression in B cells from patients with SSc is increased in the transitional subpopulation, disturbance which generates a high inhibition of production of IL-10 in this subpopulation. According to these results a possible mechanism relating B cells with the pathogenesis of this disease can be suggested, in which transitional B cells, by expressing high levels of inhibitor FcγIIb receptor, possess a decreased ability to secrete IL-10 after binding immune complexes containing autoantibodies, having then an alteration in a possible regulatory loop.

3. Introducción

3.1. La Esclerosis Sistémica (ES) o Escleroderma

La ES es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por un depósito de matriz extracelular (MEC) en la piel y en órganos internos. Este depósito conlleva a una vasculopatía oclusiva progresiva y, eventualmente, a una disfunción severa y a fallas en estos órganos (Black et al., 2009). Esto se ve reflejado en sus complicaciones características, que incluyen crisis renales, úlceras dactilares e hipertensión arterial pulmonar (Fleming and Schwartz, 2008). Pacientes con ES presentan alteraciones vasculares tanto en la circulación periférica como central, las cuales se caracterizan por una vasoconstricción transitoria que, en la circulación acral, genera un fenómeno denominado Raynaud. Este fenómeno suele preceder la aparición del resto de los síntomas de la enfermedad. La prevalencia e incidencia mundial de la ES es heterogénea y esto es debido a variaciones geográficas o étnicas, la población más estudiada es Estados Unidos en donde tiene una prevalencia de 242 casos por millón y una incidencia de 18.7 casos por millón por año (Mayes, 2003; Rojas-Serrano, 2006). La ES es más frecuente en mujeres que en hombres (3-14:1) y usualmente debuta entre la segunda y quinta década de la vida (Gabielli et al., 2009). A nivel nacional no existen datos epidemiológicos sobre esta enfermedad.

A medida que la ES progresa se incrementa el número de órganos afectados empeorando la calidad de vida de los pacientes. Dependiendo de las manifestaciones clínicas presentadas por el paciente, como el grado de esclerosis de la piel y la presencia de fibrosis o hipertensión pulmonar, la enfermedad se clasifica en difusa o limitada (ESd o ESl) (LeRoy et al., 1988; LeRoy and Medsger, 2001). Más allá de las manifestaciones clínicas existen diversos marcadores serológicos que incluso preceden la aparición de los síntomas, como son los anticuerpos antinucleares con patrón centromérico, los

anticuerpos anti-topoisomerasa I (Sci-70) y los anti-RNA polimerasa (Koenig et al., 2008).

A la fecha, pacientes con ES exhiben una respuesta reducida a la mayoría de los tratamientos existentes, siendo muy difícil controlar la progresión de la fibrosis y/o las alteraciones vasculares (Ramos-Casals et al., 2010). Las complicaciones en su tratamiento y sus diversas manifestaciones tienen a la ES como una de los desórdenes reumatológicos con la mayor mortalidad caso específico (Nihtyanova et al., 2007). Todo esto ha fomentado a médicos y científicos a intensificar la investigación y estudio de esta compleja e interesante enfermedad inmunomodulada.

3.2. Inmunopatogénesis de la ES

Actualmente las bases moleculares fundamentales en la patogénesis de la ES permanecen desconocidas, aunque muchos de los estudios se han focalizado en el rol que jugaría el sistema inmune en la fibrosis tisular. Este lento progreso se ha debido a la complejidad de combinar las dispares observaciones obtenidas sobre esta heterogénea enfermedad.

Muchos de los eventos clínicos descritos en pacientes de ES están atribuidos a la activación del sistema inmune, confiriéndole un rol central en la fisiopatología de la enfermedad (Abraham and Varga, 2005; Sakkas et al., 2006; Sakkas and Platsoucas, 2004). Evidencia de esto es la temprana infiltración de células inmunes en la piel y en los tejidos afectados, incluyendo linfocitos T y B, mastocitos y macrófagos (Prescott et al., 1992). Específicamente los linfocitos T infiltrados muestran un fenotipo activado (Kalogerou et al., 2005), lo que se ve evidenciado por los elevados niveles séricos de citoquinas como la interleuquina (IL)-4, IL-13 e IL-17. (Kurasawa et al., 2000; Sakkas et al., 1999). Particularmente, IL-4 es una fuerte molécula pro-fibrótica, característica del perfil Th2, capaz de inducir la producción de colágeno por los fibroblastos (Lee et al.,

1996), de estimular la secreción de TGF- β , otra citoquina pro-fibrótica (Ihn et al., 2001), y de estimular la infiltración de células mononucleares (Colotta et al., 1992). IL-13, también del perfil Th2, es capaz de inducir fibrosis por mecanismos dependientes de TGF- β (Lee et al., 2001). Considerando que interferón (IFN)- γ , una citoquina del tipo Th1, es capaz de inhibir la producción de colágeno (Gillery et al., 1992), sería entonces correcto calificar la ES como una enfermedad Th2. Los resultados positivos obtenidos en pacientes tratados con terapias anti-linfocitos T realza la importancia de la participación de los linfocitos T en la ES (Charles et al., 2006), centrando por varios años la investigación en este tipo celular y atribuyéndoles el rol principal como mediador del daño en esta enfermedad.

3.3. Rol de los linfocitos B en ES

Nuevos estudios han evidenciado la participación de linfocitos B y de células plasmáticas en ES, en los que se ha observado linfocitos B infiltrados en los órganos afectados por ES (Hasegawa, 2010). Además, análisis en lesiones cutáneas de pacientes con ES muestran regulación positiva de genes relacionados con linfocitos B (Whitfield et al., 2003). Sumado a esto, existe un gran número de autoanticuerpos asociados a la enfermedad tales como los anticuerpos anti-topoisomerasa I, anti-fibrilina I, anti-centrómero, anti-metaloproteinasa-3, entre otras (Czömpöly et al., 2009; Nishijima et al., 2004; Okano, 1996; Tan et al., 1999). A raíz de que varios de estos anticuerpos corresponden al isotipo IgG y que suelen preceder los síntomas de la enfermedad, se cree que una interacción entre linfocitos B y T se lleva a cabo, siendo ésta la primera etapa del proceso patogénico de la ES (Kuwana et al., 1995).

Alteraciones intrínsecas en los linfocitos B se presentan en pacientes con ES. Por ejemplo, se ha observado una sobreexpresión de CD19, un co-receptor responsable de aumentar la señalización intracelular después de la unión del antígeno al receptor de

antígeno de las células B (BCR) (Sato et al., 2000). También se ha reportado una relación entre la ESI y un polimorfismo en el gen codificante de CD22, receptor responsable de enviar una señal inhibitoria que regula la activación del BCR (Hitomi et al., 2007). En otros estudios se han reportado altos niveles séricos del factor activador de linfocitos B (BAFF), factor de supervivencia de linfocitos B, además de un incremento del transcrito de BAFF y una expresión aumentada del receptor de BAFF en las lesiones de piel de pacientes con ES (Matsushita et al., 2006). Todas estas alteraciones pueden ser responsables del fenotipo mostrado por los linfocitos B de memoria en pacientes con ES, caracterizado por una expresión incrementada de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y del receptor de muerte CD95 (Sato et al., 2004).

La presentación de antígenos mediada por los linfocitos B favorece una respuesta tipo Th2 (Mason, 1996; Stockinger et al., 1996), que esta principalmente representada por la secreción de IL-6, IL-10 y del factor de crecimiento transformante (TGF)- β (Hsieh et al., 1992; Rincón et al., 1997), citoquinas envueltas en la inducción de la síntesis de colágeno y la fibrosis de tejido (Duncan and Berman, 1991). Esto sumado a que tratamientos con anticuerpos que depletan linfocitos B resultan efectivos para esta enfermedad, constituyen evidencias importantes indicando la participación de estas células en la patogénesis de la ES (Bosello et al., 2010; Lafyatis et al., 2009).

3.4. Linfocitos B reguladores

A lo largo de los años se le ha asociado un rol inmunoregulador a los linfocitos B. Por ejemplo, ratones deficientes en linfocitos B son incapaces de recuperarse de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo murino de esclerosis múltiple (Wolf et al., 1996). Estudios posteriores mostraron que esta capacidad reside

en una población de linfocitos B secretora de IL-10, la cual se probó que generaba protección frente a varias enfermedades autoinmunes, como EAE, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis inducida por colágeno (CIA) (Fillatreau et al., 2002; Mauri et al., 2003; Mizoguchi et al., 2002). En la actualidad estas células son llamadas linfocitos B reguladores o Bregs.

El principal problema para el estudio de los Bregs reside en la falta de un marcador que las identifique del resto. Esto ha llevado a un gran número de trabajos a utilizar distintos marcajes para designar esta población. La mayoría de los estudios en ratones se han desarrollado con linfocitos B tipo B-2 (Mauri et al., 2003; Yanaba et al., 2008), aunque también se le ha conferido actividad reguladora a linfocitos B tipo B-1 CD5+ (Shimomura et al., 2008). Estudios *in vivo* muestran que precursores en etapa T2 de linfocitos B de la zona marginal del bazo (T2-MZP) co-expresan una serie de marcadores incluyendo IgM, IgD, CD19, CD21, CD23, CD24 y CD93, y que éstos suprimen el desarrollo de CIA y atenúan la severidad de lupus espontáneo (Blair et al., 2009; Evans et al., 2007).

La señal requerida para gatillar la secreción de IL-10 por estas Bregs no está cabalmente caracterizada, pero como se muestra en los modelos de EAE y CIA, es posible que la especificidad de antígeno sea necesaria (Fillatreau et al., 2002; Mauri et al., 2003). Además, se ha observado que la activación del receptor CD40, a través de su ligando CD40L, es indispensable para que las Bregs T2-MZP exhiban una función reguladora. Otros estudios indican que para la inducción de IL-10 por las Bregs es fundamental la activación de los receptores de tipo toll (TLR), TLR2 y TLR4 (Yanaba et al., 2009).

En ensayos funcionales se ha demostrado que la IL-10 derivada de Bregs inhiben la generación de respuestas del tipo Th1 y Th17 en modelos de EAE (Fillatreau et al., 2002), y la respuesta Th1 en CIA (Mauri et al., 2003), a través de la supresión de la IL-6 e IL-12 derivada de células dendríticas (Sun et al., 2005). Se ha demostrado que las Bregs participan en la generación de linfocitos T reguladores Foxp3+, en donde la secreción de IL-10 y la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 son necesarias, lo que sugiere una interacción entre linfocitos T y B (Mann et al., 2007). Más recientemente, se demostró que ratones con CIA carentes de Bregs desarrollan una enfermedad más exacerbada con un incremento de las poblaciones Th1 y Th17 y con una disminución en la población T reguladora (Carter et al., 2012; Carter et al., 2011).

3.5. Linfocitos B reguladores humanos en autoinmunidad

El estudio de linfocitos B reguladores en humanos no lleva más de 10 años en proceso, ya recién en el año 2007 Duddy y colaboradores demostraron que la activación del CD40 en linfocitos B vírgenes estimula la secreción de IL-10 (Duddy et al., 2007). Esto fue confirmado cuando la población de linfocitos B transicionales, esto es, linfocitos B emigrantes de la médula ósea en vías de maduración, de fenotipo CD19+CD24highCD38high, mostró la capacidad secretar altos niveles de IL-10 y de inhibir la producción de IFN- γ y de TNF por linfocitos T CD4+ (Blair et al., 2010). La estimulación de linfocitos B vía TLR9 y BCR muestra resultados similares (Bouaziz et al., 2010). Asimismo, la estimulación de Bregs vía CD40 también ha mostrado evidencia de generar linfocitos T reguladores alo-específicos (Zheng et al., 2010).

Sobre la frecuencia o capacidad inhibitoria de los linfocitos B reguladores en autoinmunidad, se ha descrito en esclerosis múltiple una secreción de IL-10 por linfocitos B disminuida (Duddy et al., 2007). Algo similar ocurre en pacientes con lupus

eritematoso sistémico (SLE), cuyos Bregs presentan una capacidad alterada de producir IL-10 después de la activación del CD40 (Blair et al., 2010). A pesar de estas deficiencias, reportes recientes describen elevadas frecuencias de linfocitos B transicionales en pacientes con enfermedades autoinmunes tales como SLE, artritis reumatoide (RA) y síndrome de Sjögren en comparación a individuos sanos (Iwata et al., 2011; Lin et al., 2014).

3.6. Receptores Fcγ en linfocitos B

Los receptores Fcγ son una familia de receptores cuyo ligando es la fracción cristalizante (Fc) de moléculas de IgG que forman parte de los complejos inmunes. Estos juegan un rol central en el balance inmune, controlando la respuesta inmune contra microorganismos y la inducción de la tolerancia propia. En humanos existen a la fecha cinco tipos de estos receptores, denominados FcγRI, IIa, IIb, IIc, IIIa y IIIc. Se clasifican según la naturaleza de la señal intracelular que transducen, pudiendo ser activadores o inhibidores. FcγRIIb es un receptor de baja afinidad cuya habilidad única es entregar señales inhibitorias a través de su motivo inhibitorio de inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM), ubicado en su cola citoplasmática. Este receptor se encuentra expresado en leucocitos, incluyendo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos y linfocitos B (Nimmerjahn and Ravetch, 2006).

En linfocitos B el receptor FcγRIIb es el único expresado de su familia, y juega un rol esencial en la regulación de la respuesta humoral. La regulación mediada por este receptor ocurre cuando los complejos inmunes compuestos por IgG se unen simultáneamente al BCR a través del antígeno, y al FcγRIIb a través de la fracción Fc de las IgGs. Esta interacción promueve el reclutamiento de fosfatasa que desfosforilan intermediarios claves en la cascada de señalización gatillada por la activación del BCR. Esto conlleva a la atenuación de la liberación de calcio desde compartimentos

intracelulares y de la activación de factores de transcripción, bloqueando la proliferación de linfocitos B, su diferenciación y la secreción de anticuerpos (Bolland and Ravetch, 2000).

3.7. El receptor FcγRIIb en autoinmunidad

Estudios en modelos animales reportan que la ausencia de FcγRIIb incrementa la susceptibilidad a desarrollar diversas enfermedades autoinmunes (Bolland and Ravetch, 2000). Cuando el receptor es específicamente suprimido en los linfocitos B ocurre el mismo fenómeno, denotando la importancia en la función reguladora de la cual es responsable este receptor cuando es expresado en linfocitos B (Yuasa et al., 1999).

Alteraciones específicas en la expresión de FcγRIIb se han encontrado en pacientes afectados por enfermedades autoinmunes. Polimorfismos en el gen que codifica para FcγRIIb que determinan la inhabilidad de este receptor para inhibir las señales proveniente de la activación del BCR, han sido asociados al desarrollo de SLE (Floto et al., 2005; Kono et al., 2005). Otro polimorfismo asociado a esta enfermedad se encuentra en la región promotora del gen, y que conlleva a una reducida expresión del receptor (Blank et al., 2005).

Estudios en pacientes con RA muestran correlación entre una reducida expresión de FcγRIIb y elevados títulos de autoanticuerpos (Catalán et al., 2010). Deficiencias en la habilidad de FcγRIIb para señalizar a los compartimientos intracelulares de los linfocitos B ha sido descrito en pacientes con SLE, gatillando niveles de calcio intracelular elevados (Enyedy et al., 2001). También se ha observado que el aumento natural de la expresión de este receptor en el proceso de maduración de los linfocitos B se presenta alterado en estos pacientes (Isaák et al., 2008; Mackay et al., 2006). Es importante destacar que la expresión alterada de FcγRIIb es revertida con la

administración de inmunoglobulinas intravenosas (Tackenberg et al., 2009), una terapia utilizada en varias enfermedades autoinmunes, incluyendo ES (Levy et al., 2004).



4. Hipótesis

Los linfocitos B de pacientes con Esclerosis Sistémica presentan alteraciones en la frecuencia de sus sub-poblaciones virgen, de memoria y transicional, así como en la producción y secreción de IL-10 y en la expresión y función de su receptor FcγRIIb, en comparación a los linfocitos B de donantes sanos.

5. Objetivo General

Estudiar la frecuencia de sub-poblaciones y función de los linfocitos B de pacientes con Esclerosis Sistémica para contribuir a la comprensión de los mecanismos involucrados en la pérdida de tolerancia inmunológica subyacente a esta enfermedad.

5.1. Objetivos Específicos

1. Evaluar la frecuencia de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos B, virgen, de memoria y transicional, en pacientes con Esclerosis Sistémica y en donantes sanos, y su capacidad de producción IL-10.
2. Analizar la expresión del receptor FcγRIIb en linfocitos B vírgenes, de memoria y transicionales, de pacientes con Esclerosis Sistémica y en donantes sanos.
3. Evaluar la función del receptor FcγRIIb de linfocitos B sobre la vía de señalización de su receptor de antígeno, en pacientes con Esclerosis Sistémica y en donantes sanos.
4. Correlacionar la frecuencia de las sub-poblaciones de linfocitos B, junto a la expresión y función del receptor FcγRIIb, con la severidad de la enfermedad en pacientes con Esclerosis Sistémica.

6. Materiales y Métodos

6.1. Reclutamiento y caracterización clínica de pacientes con ES.

Se reclutó un grupo de 31 pacientes con ES que cumplieran los criterios de la Asociación Americana de Reumatismo para la Esclerosis Sistémica (American-Rheumatism-Association, 1980). Fueron clasificados en ESd y ESI de acuerdo a los parámetros propuestos por LeRoy y Medsger (LeRoy and Medsger, 2001). Los pacientes fueron sometidos a una evaluación clínica inicial por Reumatólogo para determinar las características y la severidad de la enfermedad. Esta evaluación consideró: 1) Duración de los síntomas de ES desde la primera aparición del fenómeno de Raynaud; 2) Valoración nutricional (Determinación del Índice de masa corporal); 3) Ensayos generales de laboratorio (hemograma, velocidad de sedimentación de eritrocitos, perfil bioquímico, proteína C reactiva, análisis completo de orina, albúmina sérica, radiografía de tórax y electrocardiograma, anticuerpos antinucleares, anticuerpos antinucleares extraíbles); Estudios del compromiso de órganos (capilaroscopia, radiografía de tórax, espirometría, DLCO, ecocardiograma, electrocardiograma, ProBNP, manometría esofágica e intestinal); 5) Cuestionario de evaluación del estado de salud (HAQ) modificado para ES (Poole and Steen, 1991); 6) Puntaje de severidad de Medsger modificado (Medsger et al., 1999); 7) Puntaje de Rodnan para piel modificado para evaluar el compromiso de la piel (Clements et al., 1995); 8) Un registro del esquema terapéutico del paciente. Los pacientes reclutados cumplen los siguientes **criterios de inclusión**: Entre 18 y 70 años de edad; residentes de la Región Metropolitana; un puntaje de Rodnan ≥ 4 ; un puntaje de Medsger ≥ 7 ; si los pacientes estaban en tratamiento debían estar recibiendo dosis estables de metotrexato (MTX) y prednisona. Los pacientes con al menos uno de los siguientes **criterios de exclusión** no fueron considerados: pacientes de una severidad alta que afecta sus capacidades

funcionales; quienes recibían terapia biológica (anticuerpos anti-TNF, anti-receptor de IL-6, anti-CD20, etc.); quienes recibían dosis de MTX mayores a 15 mg/semana, dosis mayores a 15 mg/día de prednisona, dosis de azatioprina mayores a 100 mg/día, o quienes recibían inmunosupresores mayores como ciclosporina, ciclofosfamida o micofenolato, o alguna droga bajo estudio; pacientes diagnosticados para otra enfermedad reumática, síndrome de superposición, desórdenes linfoproliferativos, cáncer, diabetes mellitus, enfermedad crónica renal, nefropatías con una velocidad de filtración glomerular menor a 60 ml/min, otra enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia cardíaca crónica, inmunodeficiencia, enfermedades desmielinizantes, o infecciones crónicas. 53 individuos sanos fueron reclutados como grupo de control. La Tabla I resume la información con los datos más relevantes de los pacientes y donantes.

Tabla I. Características clínicas de los pacientes y controles reclutados.

| Características Clínicas | Pacientes | Controles |
|--|------------------|------------------|
| Edad (años) | 49.3 ± 11.8 | 40.0±13.7 |
| Género (hombre/mujer) | 8/23 | 25/28 |
| Tiempo desde la aparición de la ES (meses) | 102.2 ±107.7 | |
| Forma difusa/limitada | 9/22 | |
| Puntaje de Rodnan | 13.9 ± 6.1 | |
| ANA positivo | 31/31(100%) | |
| Anti-Scl70 positivo | 6/31 (19.4%) | |

6.2. Extracción de linfocitos B y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con ES.

Previa lectura y firma del consentimiento informado (Ver Anexo) por parte de cada paciente, aproximadamente 45 mL de sangre periférica fue obtenida por un profesional capacitado y depositada en tubos heparinizados. Para la obtención de PBMC, 40 mL de la sangre obtenida se mezcló con un volumen equivalente de buffer fosfato salino (PBS) (NaH_2PO_4 2,0 mM; Na_2HPO_4 10,0 mM; NaCl 1,55 M) y distribuyó por igual en 3 tubos cónicos de 50 mL. Se agregó cuidadosamente bajo la muestra 15 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, UK) para crear un gradiente de densidad y se centrifugó a 1200 g por 20 minutos. Posteriormente se extrajo la porción mononuclear situada en la fase del centro de las 3 formadas, se unificaron las 3 porciones extraídas y se lavaron con buffer PBS centrifugando 5 minutos a 1600 rpm. Luego se resuspendió las células en 10 mL de tampón PBS y se cuantificaron utilizando el método de exclusión de azul tripán en cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, PA, EUA). A continuación se apartó para tinción fenotípica el volumen necesario de suspensión celular calculado para 7 millones de células. El volumen restante se centrifugó por 5 minutos a 1600 rpm y se resuspendió en los 5 mL restantes de sangre periférica, muestra denominada sangre optimizada. Posteriormente esta muestra se procesó para la obtención de linfocitos B mediante el uso del cóctel de enriquecimiento por selección negativa *RosetteSep® Human B cell Enrichment Cocktail* (StemCell, Vancouver, Canadá), siguiendo las indicaciones del fabricante. La fracción enriquecida en linfocitos B se diluyó en buffer PBS suplementado con 2% v/v de suero fetal bovino (SFB, Hyclone, Logan, UT, EUA) y fue centrifugada por 5 minutos a 1600 rpm. El precipitado celular se resuspendió en solución de ACK (NH_4Cl 1,5 M; KHCO_3 0,1 M; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 1,0 mM) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para

lisar remanentes eritrocitarios. Luego, las células se centrifugaron por 5 minutos a 1600 rpm, resuspendidas en PBS-SFB 2% v/v, y se cuantificaron utilizando el método de exclusión de azul tripán en cámara de Neubauer. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 900 rpm por 10 minutos, para la eliminación de plaquetas. Finalmente el precipitado se resuspendió en medio de congelación (90% SFB-10% dimetil sulfóxido-DMSO) y se depositó en criotubos para su posterior congelación a -80°C y un día después su paso a nitrógeno líquido para su mejor conservación.

6.3. Extracción de linfocitos B y de células PBMC de controles sanos.

Muestras de concentrados leucocitarios (*buffy coats*) de sangre periférica de donantes sanos fueron obtenidas del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, bajo los protocolos establecidos por dicha institución y en base a donantes que aceptaron participar del proyecto previa lectura y firma de un consentimiento informado (Ver Anexo). Para la obtención de PBMC, se utilizó 1 mL del concentrado leucocitario y se procesó de igual forma que la sangre periférica de pacientes. Para la obtención de linfocitos B, el volumen restante del concentrado se procesó de igual forma que la sangre optimizada de pacientes.

6.4. Evaluación del efecto de la activación de FcγRIIb sobre la producción y secreción de IL-10 inducida por la activación del BCR

Linfocitos B frescos provenientes de donantes sanos se sembraron en placas de 24 pocillos en medio RPMI (HyClone, GE Healthcare, USA) suplementado con SFB al 10% v/v y con Penicilina/Estreptomicina (Thermo-Fisher Scientific, USA) 100x al 1% v/v, a una densidad de 10^6 células/mL. Las células se estimularon con un anticuerpo agonista del BCR (Goat Anti-Human IgG + IgM (H+L); Jackson Immunoresearch, USA)

a una concentración de 5µg/ml. Para estimular el receptor FcγRIIb se utilizaron fragmentos Fc de IgG humana a 5 µg/mL (Jackson ImmunoResearch, USA) agregados previamente por calor a 65°C por 30 minutos. Las células se incubaron con o sin estos estímulos por un periodo de 48 hrs. 5 hrs antes de cosechar las células se agregó a cada condición phorbol 12-myristate 13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich, USA) a 50 ng/ml, ionomicina (Io) (Sigma-Aldrich, USA) a 1 µg/ml para estimular la producción de citoquinas y brefeldina A (eBioscience, USA) a 3 µg/ml para inhibir la secreción celular. Las células se cosecharon para tinción intracelular de IL-10 y posterior evaluación por citometría de flujo, y los sobrenadantes fueron almacenados a -80°C para su posterior análisis por ELISA.

6.5. Evaluación del efecto de la señalización de FcγRIIb sobre la fosforilación de Akt vía activación del BCR

Linfocitos B de controles sanos se cultivaron en placas de 48 pocillos en medio RPMI SFB 10% v/v y con Penicilina/Estreptomicina 100x al 1% v/v, a una densidad de 10⁶ células/mL. Para estimular el BCR, se utilizó el anticuerpo agonista del BCR a 5 µg/mL, por 5 minutos. Para estimular el receptor FcγIIb se utilizaron fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor, a 5µg/mL, 30 minutos antes de la estimulación del BCR. A modo de comprobar el efecto de los agregados de Fc sobre el receptor FcγRIIb, se utilizó un inhibidor de la fosfatasa SHIP-1, 3α-Aminocholestane (3AC, Merckmillipore, Alemania) a una concentración de 6.25 µM, el cual fue agregado 1 hora antes de la estimulación del BCR. Luego de los 5 minutos de estímulo con el agonista del BCR las células fueron rápidamente fijadas con Fixation Buffer (BD Bioscience, USA) e incubadas por 15 minutos a 37°C. Finalmente las células fueron cosechadas para la tinción intracelular de Akt.

6.6. Evaluación en la producción y secreción de IL-10 en linfocitos B de pacientes y de donantes sanos.

Se utilizaron diversas estrategias de estimulación de los linfocitos B para su posterior análisis en la producción de IL-10. Se cultivaron 2×10^5 linfocitos B por 48 horas en placas de 96 pocillos con fondo cóncavo bajo las siguientes condiciones: 1) células sin estímulo; 2) células estimuladas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo agonista del BCR; 3) células estimuladas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo agonista del BCR y con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de agregados de Fc; 4) células estimuladas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CpG ODN2006 (Invivogen, USA) para activar el TLR9; 5) células estimuladas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo agonista del BCR y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CpG ODN2006 y 6) células co-cultivadas en razón 10:1 con una línea fibroblastos de embrión de ratón transfectadas con el gen que transcribe para la proteína CD40L humana (NIH3T3/tCD40L), con la finalidad de estimular el CD40 de los linfocitos B. En la Figura 1 podemos observar la estrategia de estímulos utilizados. Para todas estas condiciones se agregó en las últimas 5 horas de incubación PMA, Ionomomicina y Brefeldina A a las concentraciones señaladas anteriormente. Finalmente las células se cuantificaron utilizando el método de exclusión de azul tripán en cámara de Neubauer y se cosecharon para su posterior tinción extracelular de moléculas de superficie e intracelular para IL-10. Los sobrenadantes se alicuotaron y almacenaron a -80°C para su posterior análisis por ensayos de ELISAs.

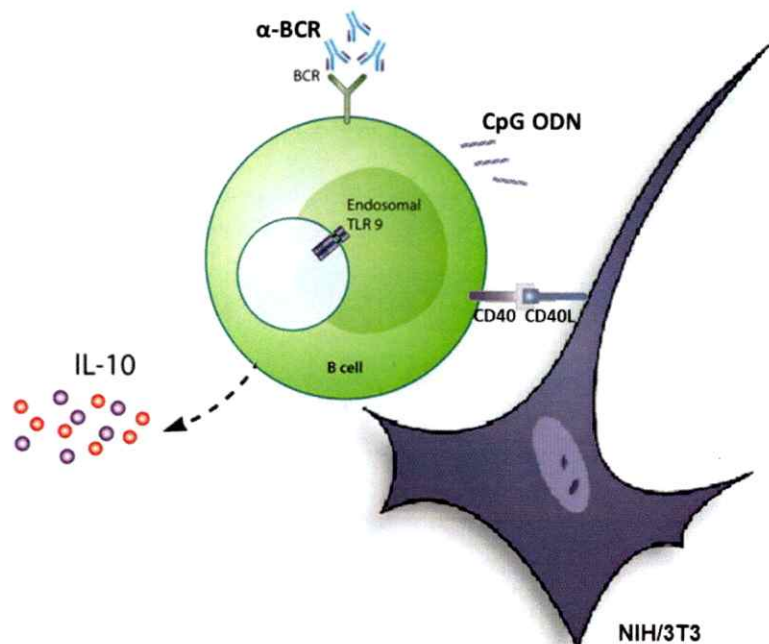


Figura 1. Esquema de estímulos utilizados para activar linfocitos B. Linfocitos B purificados fueron activados vía BCR por un anticuerpo anti-BCR, vía TLR9 por CpG y vía CD40 utilizando fibroblastos (NIH/3T3) que expresan CD40L.

6.7. Citometría de Flujo

Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron los siguientes: anti (α -) CD19 FITC, α -CD24 PEcy7, α -CD38 APC (Biolegend, San Diego, CA, EUA), α -CD32 PE (clone 7.3, Fitzgerald Industries International, USA), α -IL-10 PE (ebioscience, USA), α -pAkt (s473) Alexa Fluor 488, α -Akt1 Alexa Fluor 488 (BD Bioscience, USA).

Las muestras de PBMC tanto de pacientes como de controles sanos se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo cónico a una densidad de 2×10^6 células/mL, se centrifugaron a 2000 rpm por 2 minutos a 4°C , y resuspendieron en PBS-SFB al 2% v/v. Luego, las células se incubaron con los anticuerpos de superficie α -CD19 FITC, α -CD24 PEcy7, α -CD38 APC y α -CD32 PE por 30 minutos, a 4°C y en oscuridad. Al término de la incubación las células fueron lavadas 2 veces con PBS + 2% SFB v/v y se resuspendieron en buffer FACS (BD Bioscience, USA) para su posterior análisis por citometría de flujo.

Los linfocitos B cosechados de los cultivos de 48 hrs se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo cónico y se tiñeron extracelularmente con los anticuerpos α -CD24 PEcy7 y α -CD38 APC, y posteriormente se realizó la tinción intracelular. Para tales efectos, las células se resuspendieron en buffer fixation/permeabilization (eBioscience) y se incubaron a 4°C por 30 minutos, en oscuridad. Pasado este tiempo, se lavaron con buffer permwash (eBioscience) y se agregó el anticuerpo anti-IL10 PE por 40 minutos a temperatura ambiente. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células se lavaron con buffer permwash y se resuspendieron en buffer FACS (eBioscience, USA) para su posterior análisis por citometría de flujo.

La tinción para proteínas fosforiladas se llevó a cabo inmediatamente después de la cosecha de las células. Luego de la fijación, las células se lavaron con PBS + 2% SFB v/v, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en el buffer *Perm Buffer III* (BD Phosflow™, BD Bioscience, USA) e incubaron en hielo por 30 minutos. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS + 2% SFB v/v. Cada condición se separó en 2 pocillos para así poder incubar una fracción con el anticuerpo anti-pAkt Alexa Fluor 488 y la otra con el anticuerpo anti-Akt1 Alexa Fluor 488. Se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente la células se lavaron con PBS + 2% SFB v/v y se resuspendieron en buffer FACS para su posterior análisis por citometría de flujo.

Para todos los casos las células se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur, usando el programa computacional CellQuest Pro (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, EUA), y el análisis posterior de los datos se realizó usando el programa WinMDI 2.9 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA) y el programa FlowJo 7.6.1 (Tree Star Inc, Ashland, OR, EUA).

6.8. Cuantificación de IL-10 por ELISA

La cuantificación de la citoquina IL-10 secretada por los linfocitos B se realizó mediante un ensayo de ELISA tipo *sándwich*. Los anticuerpos α -IL-10 (captura), α -IL-10-Biotina (detección), la citoquina rhIL-10, y la enzima HRP conjugada con avidina fueron provistas por eBioscience. En placas de 96 pocillos transparentes y con fondo plano MaxiSorp (Nunc, USA) se incubó 1 μ g/mL de anticuerpo de captura a 4°C durante una noche, se lavó con PBS suplementado con Tween 20 (US Biologicals, Swampscott, MA, EUA) al 0,05% v/v y se dejó bloqueando con PBS suplementado con albúmina de suero bovino (BSA; Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, EUA) al 1% p/v. Luego de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó y cargó con las muestras previamente descongeladas y con su respectiva curva de calibración estándar, dejando en incubación por la noche a 4°C. Posteriormente, la placa se lavó y cargó con 1 μ g/mL de anticuerpo de detección y con avidina-HRP 1:500, se dejó en incubación por 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se lavó la placa y se agregó el sustrato TMB (Biolegend) y se dejó en incubación en oscuridad hasta que los puntos más altos llegaron a una densidad óptica (DO), medida a 620 nm, de 0,6. Para detener la reacción enzimática se agregó H₂SO₄ 1M, y la solución cambió de color azul a amarillo. Finalmente se midió la DO a 450 nm, normalizada con la DO a 620 nm, en un lector de absorbancia para placas (Tecan, Männedorf, Suiza).

6.9. Análisis estadísticos.

Los datos se procesaron en el software Graphpad Prism versión 5.01 (San Diego, CA, USA) para Windows. Para el análisis estadístico y la determinación de

significancia entre las distintas condiciones en estudio, se utilizó el test de ANOVA de una vía con test de Tukey como post-test, o la prueba t de student, considerando los valores de $p < 0.05$ como significativos.

7. Resultados

7.1. Definición de las subpoblaciones de linfocitos B de sangre periférica.

Para la selección de las subpoblaciones de linfocitos B se utilizó la citometría de flujo. A partir del PBMC obtenido se seleccionó mediante los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) la población linfocitaria (Fig. 2A). Desde de la región establecida se seleccionó la población de linfocitos B mediante el uso del marcador CD19 (Fig. 2B). Finalmente utilizando la región CD19+ y en función de la variación de expresión de los marcadores de superficies CD24 y CD38 se definieron las tres subpoblaciones de linfocitos B: CD19+CD24highCD38high para los linfocitos B transicionales, CD19+CD24intCD38int para los linfocitos B vírgenes y CD19+CD24highCD38- para los linfocitos B de memoria (Blair et al., 2010) (Fig. 2C).

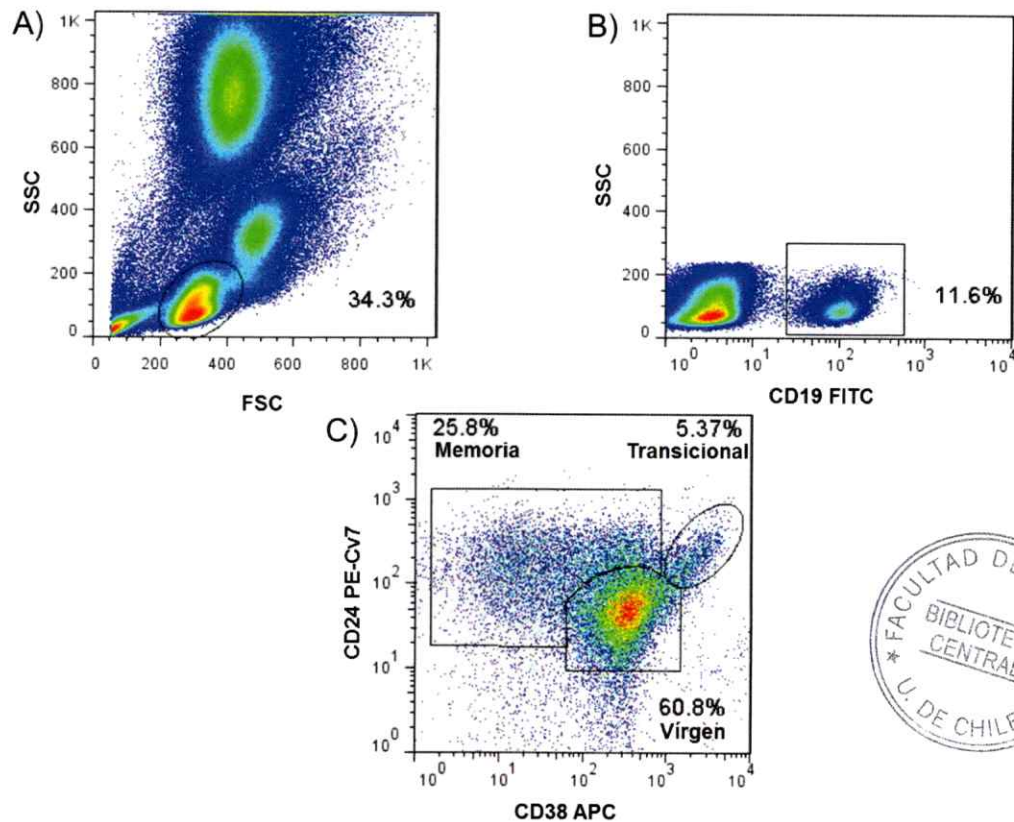


Figura 2. Estrategia de selección de subpoblaciones de linfocitos B desde sangre periférica. A) Selección de la población linfocitaria desde células mononucleares de sangre periférica (PBMC). B) Selección de la población de linfocitos B desde la población linfocitaria mediante la expresión de CD19. C) Selección de las 3 subpoblaciones de linfocitos B mediante la expresión de los marcadores CD24 y CD38.

7.2. Comparación en la frecuencia de linfocitos B y de sus subpoblaciones en sangre periférica entre controles sanos y pacientes con ES.

El porcentaje de linfocitos B en sangre periférica de 24 pacientes y 24 controles se determinó mediante citometría de flujo y utilizando la estrategia mencionada anteriormente (Fig. 3).

Como se puede observar en la figura 3A, los pacientes con ES presentan un elevado porcentaje de células CD19⁺ en comparación a los controles sanos ($p=0.0489$) (Fig. 3A).

Los análisis de subpoblaciones de linfocitos B se realizaron en 30 pacientes y en 31 controles. Como se observa en la figura 3B, existe un perfil similar en la distribución de las subpoblaciones de linfocitos B en ambos grupos, siendo la población virgen la que presenta mayor frecuencia, seguida de la población de memoria y en menor frecuencia la población transicional (Fig. 3B).

Sin embargo, se observan diferencias al comparar la frecuencia de cada subpoblación. La población de memoria está drásticamente disminuida en pacientes con ES ($p=0.0003$), mientras que las poblaciones virgen y transicional se encuentran incrementadas en los pacientes ($p=0.0148$, $p=0.0442$) (Fig. 3B).

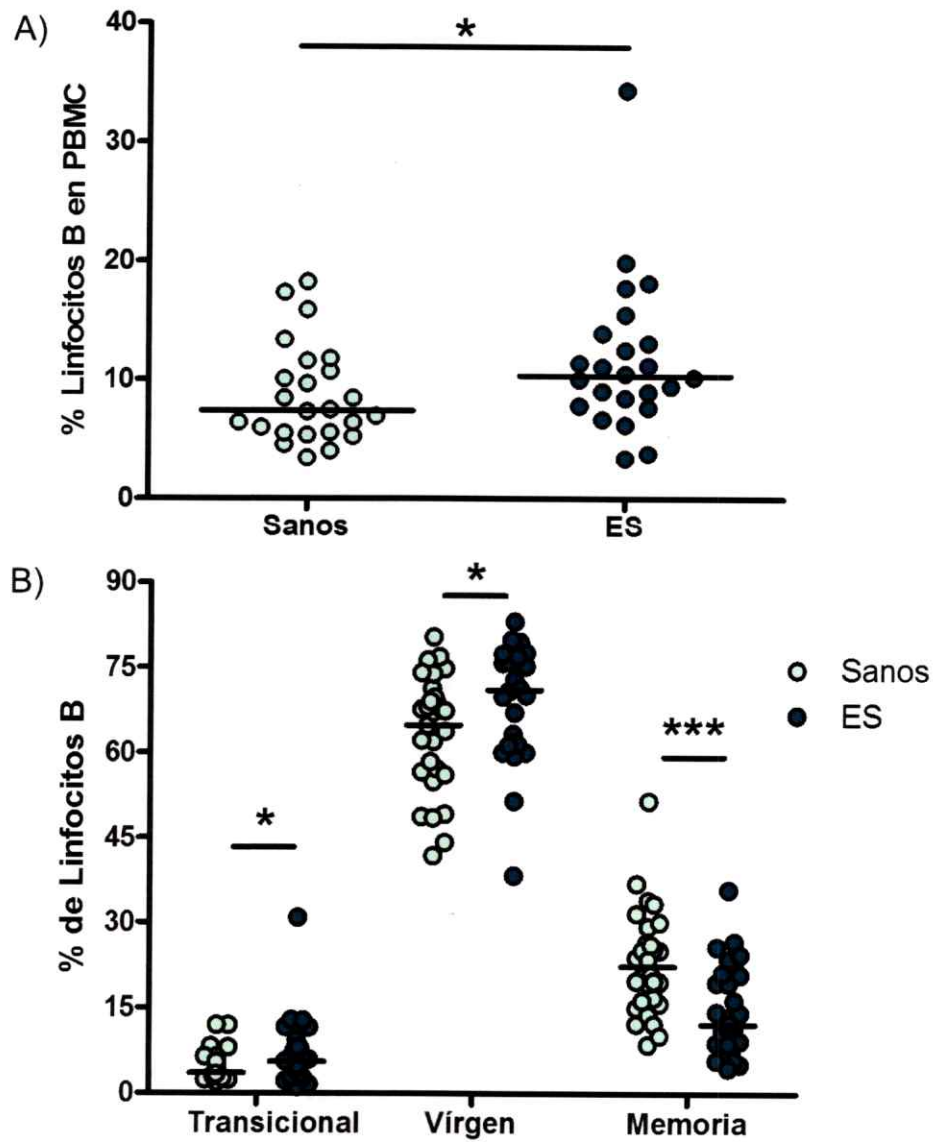


Figura 3. Frecuencia de la población de linfocitos B y de sus subpoblaciones en pacientes con ES y en controles sanos. A) Porcentaje de linfocitos B en PBMC de pacientes con ES (n=24) y en controles sanos (n=24). B) Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B, transicional, vírgen y memoria, en pacientes con ES (n=30) y controles sanos (n=31). *p<0.05, ***p<0.001.

7.3. Inducción de la producción y secreción de IL-10 en linfocitos B.

Para el estudio de la producción y secreción de IL-10 se estimuló el BCR, el TLR9 y el CD40 de linfocitos B aislados según fue descrito en materiales y métodos.

Como podemos observar en la figura 4A, todos los estímulos fueron capaces de inducir la producción de IL-10. α -BCR ($p < 0.005$), CpG, α BCR+CpG y CD40L ($p < 0.001$ los tres) aumentaron significativamente el porcentaje de linfocitos B productores de IL-10 en relación a las muestras sin estímulo (Fig. 4A). Sin embargo la secreción de IL-10 presenta un perfil distinto. Sólo los estímulos que involucran el agonista del BCR presentan un aumento en la concentración de IL-10 en sobrenadante ($p < 0.005$) (Fig. 4B).

Finalmente se analizaron los niveles de producción de IL-10 en las diferentes subpoblaciones de linfocitos B. Como Todas las subpoblaciones producen IL-10, pero es la subpoblación transicional la cual presenta la mayor frecuencia de células IL-10+ en todas las condiciones de estímulo, incluso en células sin estimular (Fig. 4C).

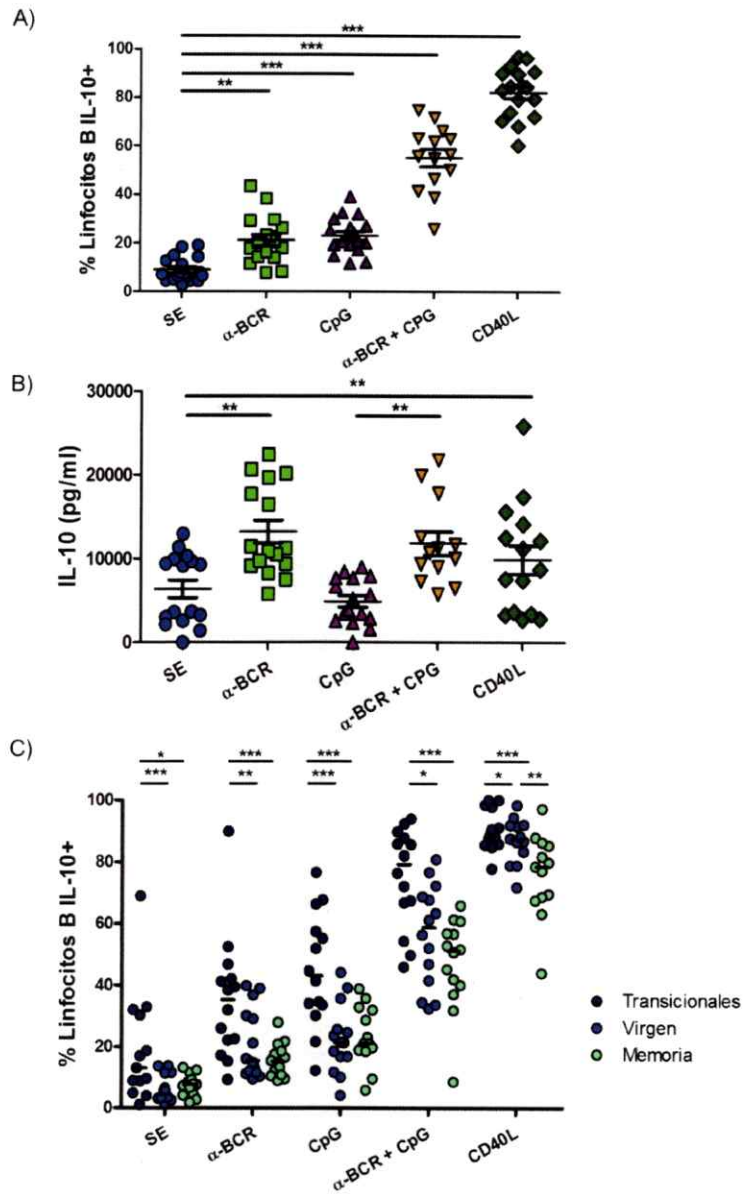


Figura 4. Niveles de secreción y producción de IL-10 en linfocitos B purificados de sangre periférica. Linfocitos B fueron cultivados por 48 horas y dejados sin estímulo (SE) o en presencia del agonista del BCR (α -BCR), del tlr9 (CpG) o del CD40 (CD40L). A) Porcentaje de linfocitos B IL-10+ en células de controles sanos (n=14) activadas con diferentes estímulos. B) Concentración de IL-10 secretada por linfocitos B de controles sanos (n=16). C) Porcentaje de linfocitos B IL-10+ separados por subpoblaciones. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.4. Capacidad de los linfocitos B de pacientes con ES de producir y secretar IL-10

Los linfocitos B aislados de pacientes (n=16) y de controles (n=16) sanos fueron estimulados por 48 horas bajo los estímulos antes mencionados. Se realizó una tinción intracelular para IL-10 y prueba de ELISA para evaluar la misma citoquina secretada al sobrenadante (Fig. 5)

Como podemos observar en la figura 5A, las células de pacientes con ES son capaces de secretar IL-10 a concentraciones similares a los controles sanos. Sólo en la condición sin estimular los linfocitos B de pacientes presentan disminuida capacidad de secretar IL-10 ($p=0.0234$) (Fig. 5A).

Al analizar la producción de IL-10 intracelular en las células cosechadas, podemos observar que los pacientes con ES presentan menores frecuencias de linfocitos B IL-10+ frente a los agonistas del BCR ($p=0.0042$ y del TLR9 ($p=0.0022$), y en las células sin estimular ($p=0.0062$) (Fig. 5B).

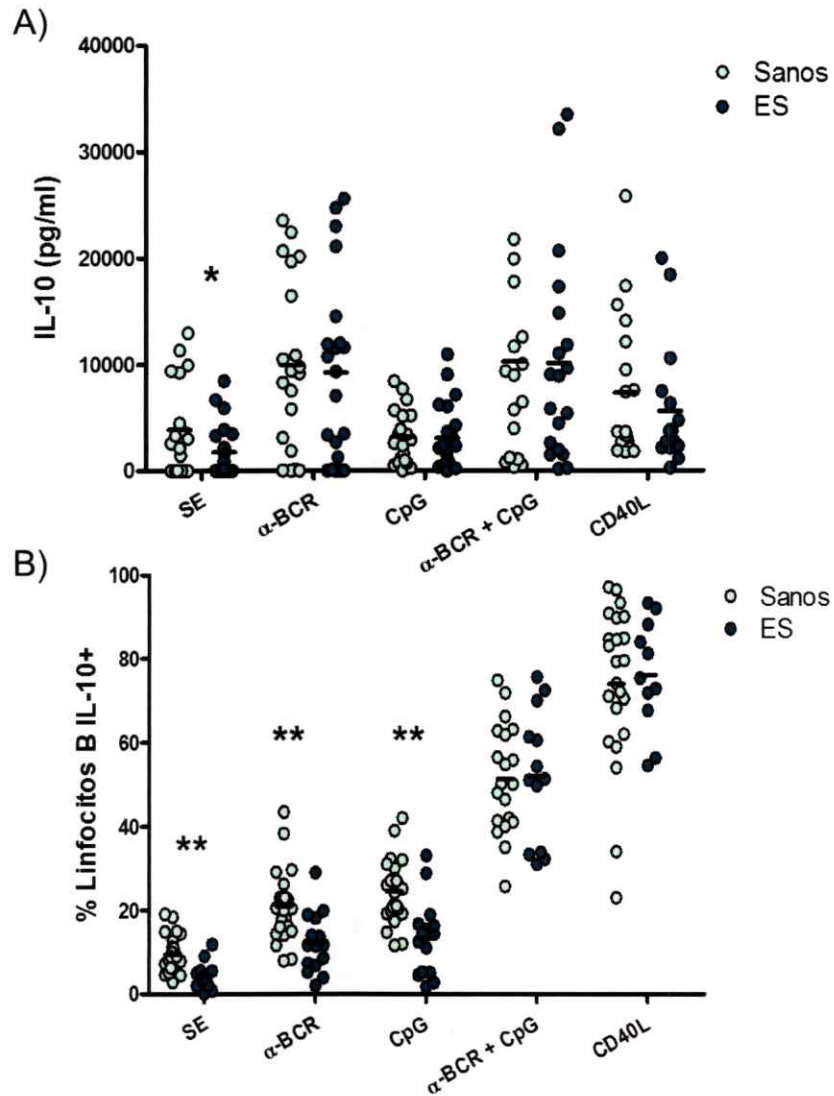


Figura 5. Niveles de secreción y producción de IL-10 en linfocitos B de pacientes con ES y en controles sanos. Linfocitos B fueron cultivados por 48 horas y dejados sin estímulo (SE) o en presencia del agonista del BCR (α -BCR), del tlr9 (CpG) o del CD40 (CD40L). A) Porcentaje de linfocitos B IL-10+ en células de pacientes con ES (n=14) y en controles sanos (n=14). B) Concentración de IL-10 secretada por linfocitos B de pacientes con ES (n=16) y controles sanos (n=16). SE: Sin estímulo *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.5. Expresión de FcγRIIb en linfocitos B de pacientes con ES y de controles sanos.

Se determinó mediante citometría de flujo la expresión del receptor FcγIIb en la superficie de los linfocitos B de pacientes (n=30) y controles (n=25). Se analizó por subpoblaciones para observar diferencias en el patrón de expresión de este receptor (Fig. 6).

En la figura 6A podemos observar que en los linfocitos B de controles sanos la subpoblación de memoria presenta niveles elevados de expresión del receptor en comparación con las subpoblaciones virgen y transicional ($p=0.0016$, $p=0.0123$ respectivamente) (Fig. 6A). Interesantemente los linfocitos B de pacientes con ES presentan un perfil de expresión distinto, dado que la subpoblación transicional presenta mayor niveles de expresión que la subpoblación virgen ($p=0.0004$), mientras que la subpoblación de memoria no se diferencia del resto (Fig. 6B).

Al comparar los niveles de expresión del receptor entre pacientes y controles observamos que la subpoblación transicional de pacientes con ES expresa niveles mucho más altos que la de controles sanos ($p=0.0004$). También se observa una expresión aumentada en la subpoblación virgen de pacientes ($p=0.0482$) (Fig. 6C).

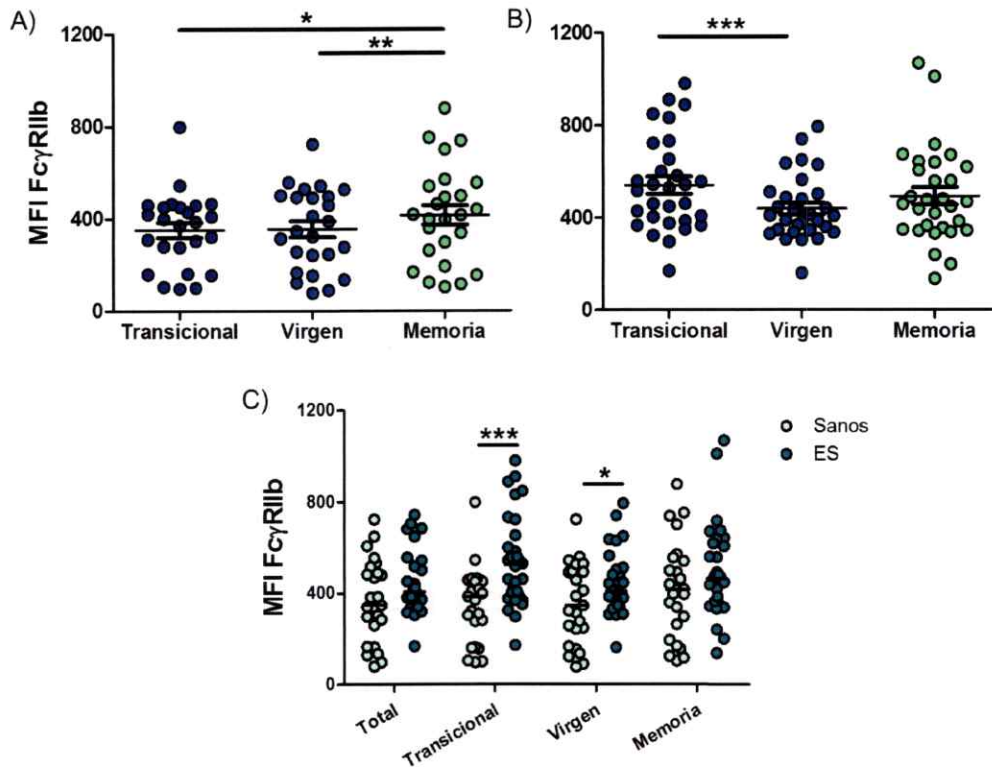


Figura 6. Niveles de expresión de FcγRIIb en linfocitos B de pacientes con ES y en controles sanos. La intensidad de fluorescencia media (MFI) fue utilizada para interpretar la expresión. A) Expresión de FcγRIIb en subpoblaciones de controles sanos (n=25). B) Expresión de FcγRIIb en subpoblaciones de pacientes con ES (n=30). C) Comparación de la expresión de FcγRIIb entre pacientes y controles por subpoblaciones. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.6. Activación del receptor FcγRIIb

A fin de poder estudiar el efecto del receptor FcγRIIb es necesario activarlo de forma independiente al estímulo del BCR. Para esto, se utilizaron fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor para simular el efecto de complejos inmunes. Se realizó una tinción intracelular para Akt fosforilado para observar el efecto inhibitorio del receptor sobre la activación del BCR, ya que este intermediario es uno de los blancos de las fosfatasas activadas por FcγRIIb. Se utilizó el inhibidor 3AC como control

negativo, dado que inhibe la fosfatasa SHIP-1, reclutada por receptor FcγRIIb para desfosforilar intermediarios río arriba de Akt.

En la figura 7A podemos observar un dotplot representativo del aumento en el Akt fosforilado (pAkt) producto de la activación del BCR por un anticuerpo agonista, sin alterar el nivel de Akt total dentro de los linfocitos B (Fig. 7A).

Como podemos observar en la figura 7B, el porcentaje de fosforilación de Akt disminuyó en presencia de los fragmentos de Fc humanos agregados por calor, y este efecto fue revertido al utilizar el inhibidor 3AC. El porcentaje de fosforilación de Akt está dado por la razón entre el porcentaje de Akt fosforilado y el porcentaje de Akt total en las células.

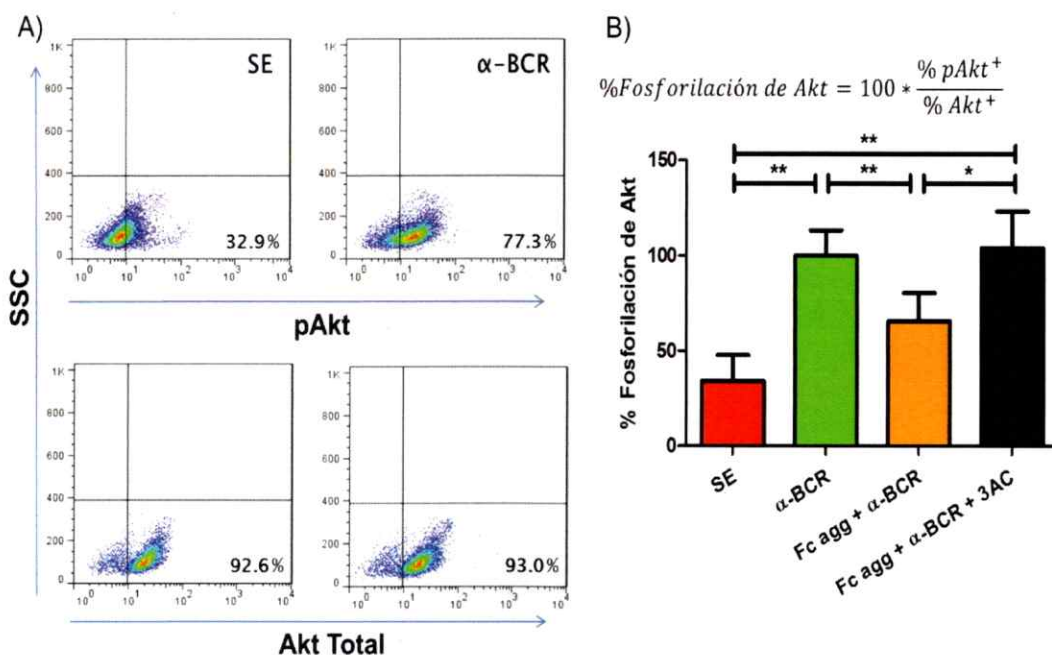


Figura 7. Efecto de los fragmentos Fc humanos agregados por calor en la fosforilación de Akt secundaria a la activación de BCR. Linfocitos B fueron dejado sin estimular (SE) o estimulados por 5 minutos con un agonista del BCR (α-BCR), el cual fue añadido también a linfocitos B incubados por 30 minutos con fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor (Fc agg) e incubados o no con el inhibidor 3-α-aminocolestano (3AC) por 1 hora A) Dotplots representativos del aumento de Akt fosforilado (pAkt) en presencia del estímulo activador del

BCR (α -BCR). B) Porcentaje de fosforilación de Akt en presencia de fragmentos Fc humanos agregados por calor (n=4). *p<0.05, **p<0.01.

7.7. Efecto de la activación del receptor Fc γ RIIb sobre la producción de IL-10 por linfocitos B

Una vez establecida la activación del Fc γ RIIb por los fragmentos Fc, se analizó su efecto sobre la producción y secreción de IL-10 en linfocitos B. Para esto, linfocitos B fueron estimulados por 48 horas con α -BCR en conjunto con los fragmentos Fc. Pruebas de ELISA y citometría de flujo fueron realizadas para medir la producción y secreción de IL-10 (Fig. 8).

La secreción de IL-10 inducida por la activación del BCR fue drásticamente reducida a niveles basales cuando se las células estuvieron en presencia de los fragmentos Fc (Fig. 8A). El porcentaje de linfocitos B IL-10⁺ también disminuyó, pero en menor proporción (Fig. 8B).

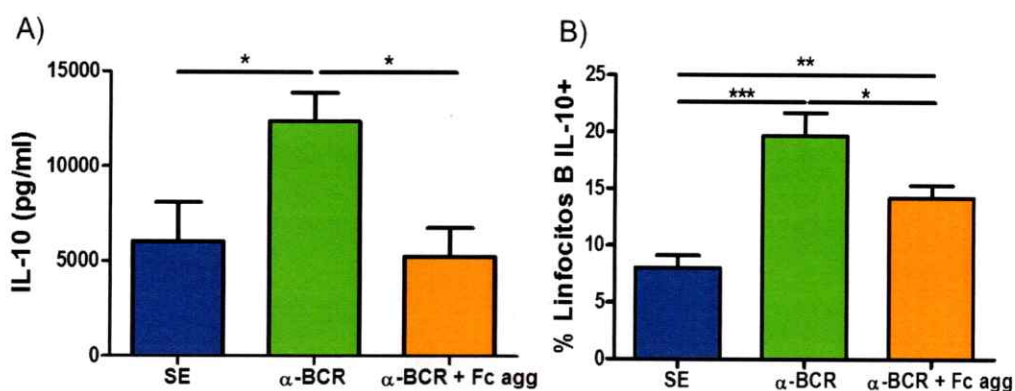


Figura 8. Efecto de la activación de FcγRIIb en la secreción y producción de IL-10 en linfocitos B purificados de sangre periférica. . Linfocitos B fueron dejado sin estimular (SE) o estimulados por 48 horas con un agonista del BCR (α-BCR), o en conjunto con fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor (Fc agg) A) Inhibición de la secreción de IL-10 mediada por fragmentos Fc humanos en linfocitos B (n=3). Reducción en el porcentaje de linfocitos B IL-10+ mediada por fragmentos Fc humanos en linfocitos B (n=14). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.8. Comparación de la función de FcγRIIb en linfocitos B de pacientes con ES y controles sanos.

Linfocitos B de pacientes y de controles fueron sembrados y estimulados por 48 horas con α-BCR en conjunto con los fragmentos Fc con la finalidad de observar alguna alteración en la función inhibitoria del receptor FcγRIIb. Pruebas de ELISA y citometría de flujo fueron realizadas para medir la secreción y producción de IL-10 por linfocitos B (Fig. 9).

Los linfocitos B de controles y de pacientes con ES presentaron inhibición mediada por fragmentos Fc humanos en la secreción y producción de IL-10 gatillada por la activación del BCR, medida tanto como el porcentaje de linfocitos B IL-10+ (Fig. 9A y B) como la concentración de IL-10 en sobrenadantes (Fig. 9C y D). Al analizar la inhibición en la producción de IL-10 dentro de las subpoblaciones de linfocitos B, se observa que ésta se encuentra únicamente presente en la subpoblación transicional, tanto en pacientes como en controles sanos (Fig. 10).

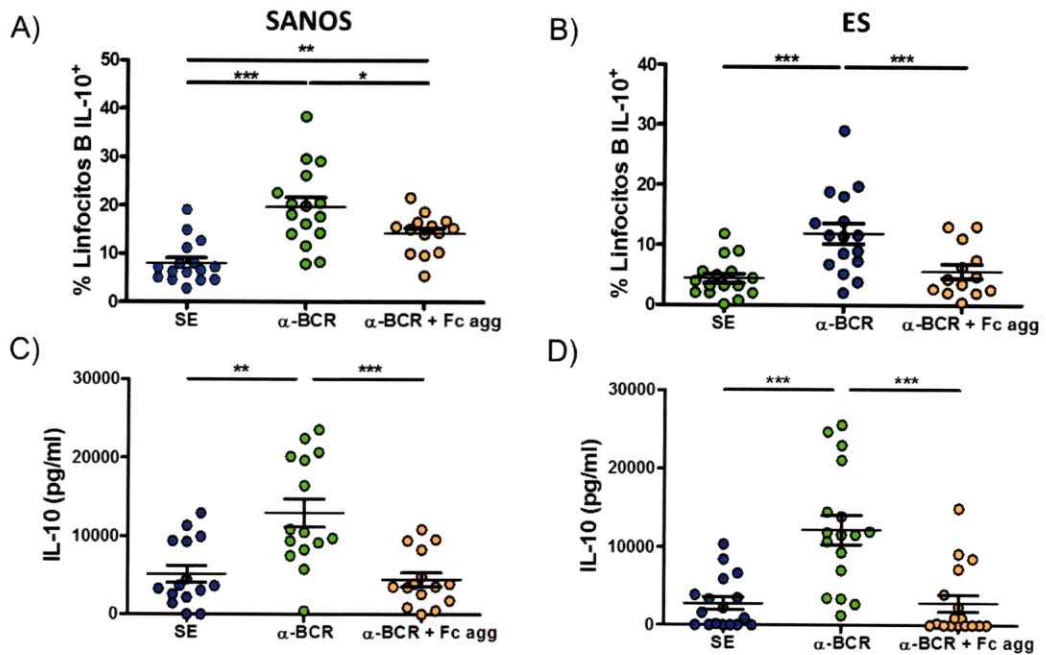


Figura 9. Inhibición en la secreción y producción de IL-10 mediada por fragmentos Fc agregados en linfocitos B de pacientes con ES y en controles sanos. Linfocitos B fueron dejado sin estimular (SE) o estimulados por 48 horas con un agonista del BCR (α -BCR), o en conjunto con fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor (Fc agg). A) y B) Inhibición del porcentaje de linfocitos B IL-10⁺ en controles (n=14) y en pacientes (n=13) respectivamente. C) y D) Inhibición de la secreción de IL-10 por linfocitos B en controles (n=15) y pacientes (n=17) respectivamente. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

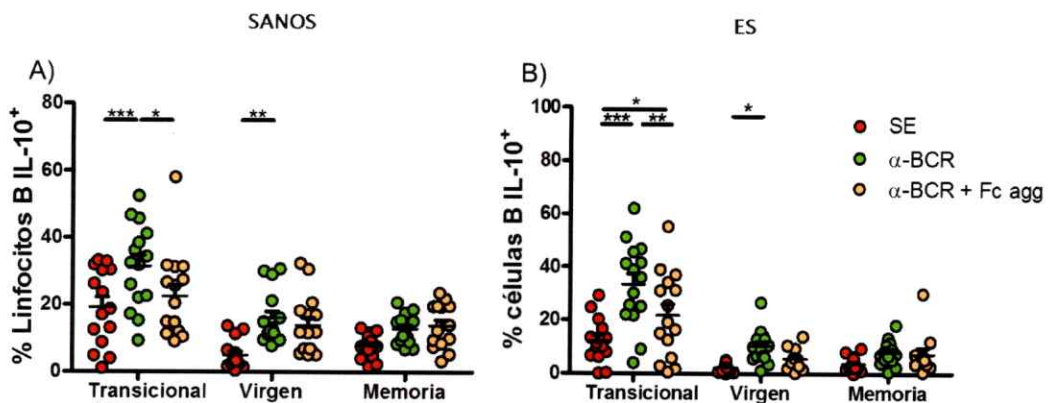


Figura 10. Inhibición en la producción de IL-10 mediada por fragmentos Fc agregados en la subpoblaciones de linfocitos B de pacientes con ES y en controles sanos. Linfocitos B fueron dejado sin estimular (SE) o estimulados por 48 horas con un agonista del BCR (α -BCR), o en conjunto con fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor (Fc agg). Se muestra la inhibición en el porcentaje de linfocitos B IL-10⁺ en las subpoblaciones transicional, virgen y memoria en linfocitos B de controles (A, n=15) y pacientes con ES (B, n=15). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Para cuantificar la función del receptor FcγRIIb en la inhibición de la producción de IL-10 en pacientes con ES y controles sanos, se calculó un índice de inhibición correspondiente a la razón entre el porcentaje de linfocitos B IL-10+ inducidos por la activación del BCR y el porcentaje de linfocitos IL-10+ inducidos por la activación del BCR y en presencia de fragmentos Fc agregados.

Como podemos observar en la Figura 11, la activación de FcγRIIb en linfocitos B de pacientes ES inhibe significativamente de mejor forma la producción de IL-10 que en los linfocitos B de controles sanos. Al calcular este índice para las subpoblaciones, encontramos que sólo la población transicional de pacientes con ES presenta un elevado índice de inhibición en comparación a controles sanos (Fig. 11).

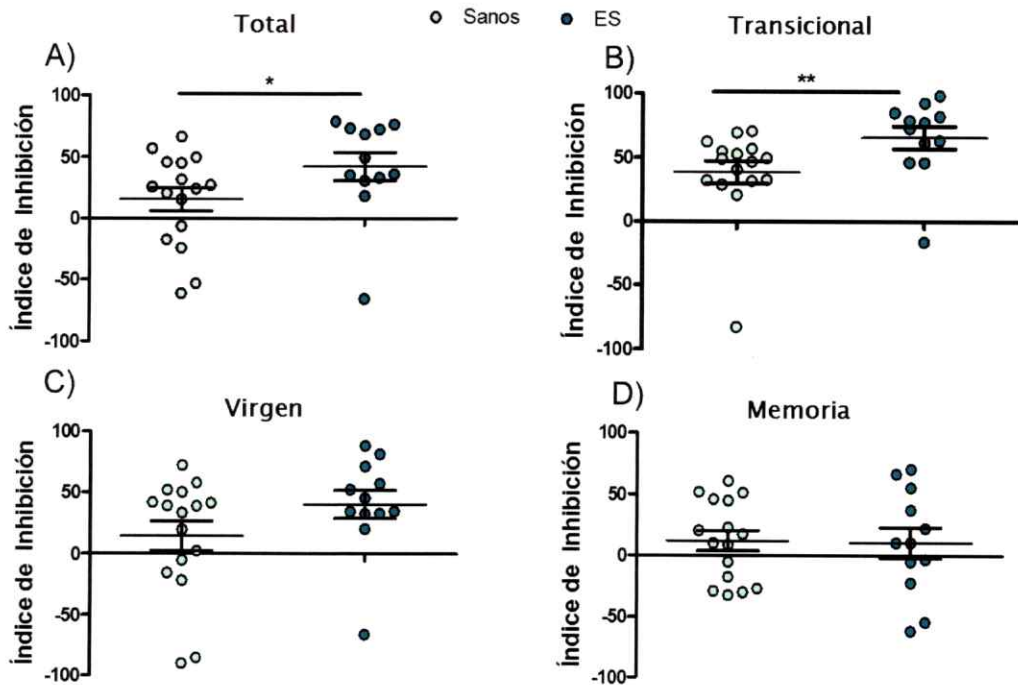


Figura 11. Índice de inhibición calculado para cada subpoblación de linfocitos B. Índice calculado para la inhibición mediada por fragmentos Fc humanos en la población de linfocitos B total (A) y sus subpoblaciones transicional (B), virgen (C) y memoria (D) para controles sanos (n=15) y pacientes con ES (n=12). *p<0.05, **p<0.01

7.9. Asociación entre la frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B y la severidad de la ES

A fin de evaluar si las frecuencias de las subpoblaciones de linfocitos B tienen conexión con la severidad la ES, se realizaron análisis estadísticos en función del tipo de ES y del puntaje de Rodnan, que representa la severidad de la enfermedad.

Como muestra la Figura 12, no se logró encontrar asociación entre la frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B y los parámetros antes descritos.

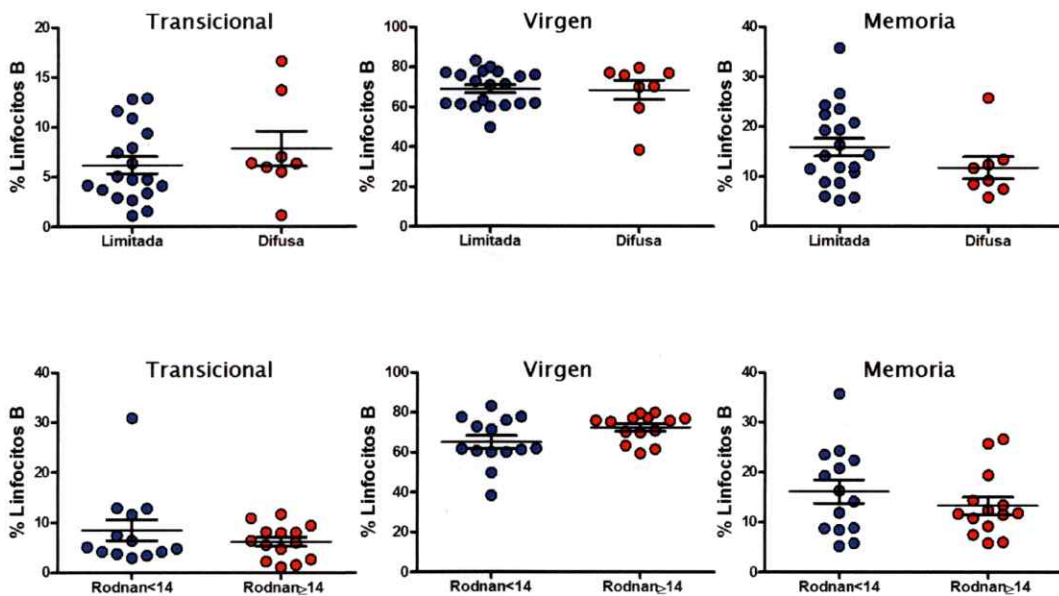


Figura 12. Asociación entre las subpoblaciones de linfocitos B y la severidad de la enfermedad. Relación de las subpoblaciones de linfocitos B transicional, virgen y memoria con el tipo ES, limitada o difusa (panel superior), y con la severidad de la enfermedad determinada por un puntaje de Rodnan mayor o menor a 14 (panel inferior).

7.10. Asociación entre los niveles expresión de FcγRIIb en las subpoblaciones de linfocitos B y la severidad de la ES

A fin de evaluar si los niveles expresión de FcγRIIb en las subpoblaciones de linfocitos B tienen conexión con la severidad la enfermedad, se realizaron análisis estadísticos en función del tipo de ES y del puntaje de Rodnan.

Como muestra la Figura 13 no se logró encontrar relación entre los niveles de expresión de FcγRIIb en las subpoblaciones de linfocitos B y los parámetros clínicos evaluados.

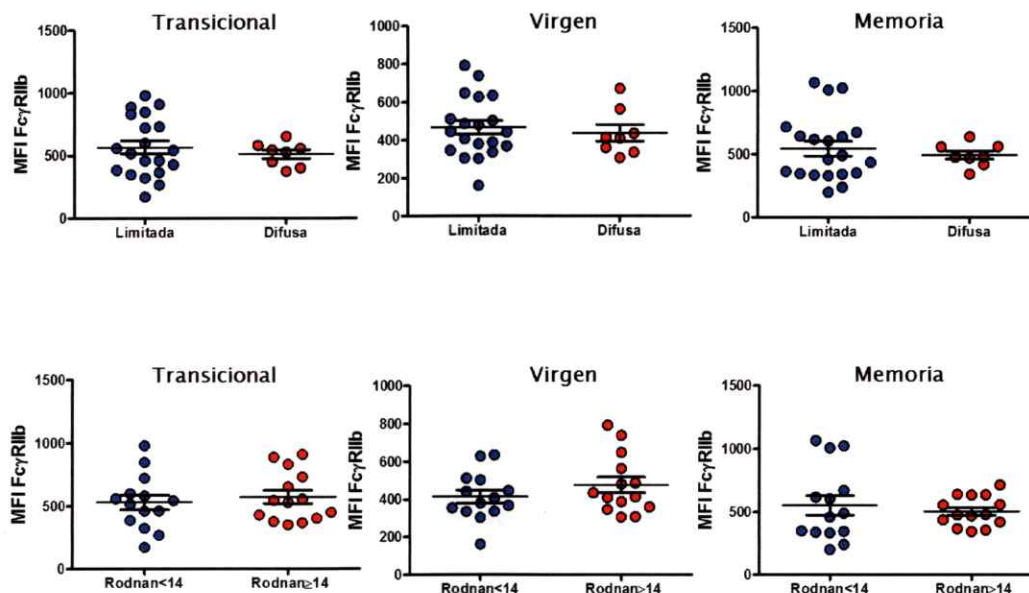


Figura 13. Correlaciones entre la expresión de FcγRIIb en las subpoblaciones de linfocitos B y la severidad de la enfermedad. Relación de la expresión de FcγRIIb en las subpoblaciones de linfocitos B transicional, virgen y memoria, con el tipo ES, limitada o difusa (panel superior) y con la severidad de la enfermedad determinada por el puntaje de Rodnan (panel inferior).

7.11. Asociación entre la capacidad de los linfocitos B de pacientes con ES de secretar IL-10 y la severidad de la enfermedad.

Los niveles de secreción de IL-10 por linfocitos B estimulados por 48 horas vía BCR, TLR9 y CD40 no se diferencian significativamente entre pacientes que presentaron distintos tipos de ES (Fig. 14).

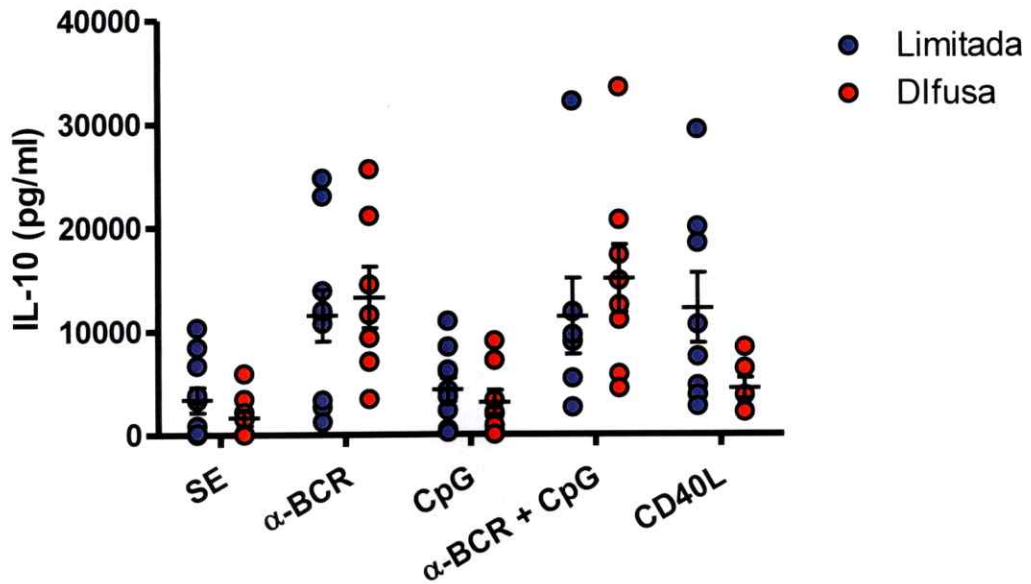


Figura 14. Asociación entre la capacidad de los linfocitos B de pacientes con ES de secretar IL-10 y el tipo de ES manifestada. Linfocitos B fueron cultivados por 48 horas y dejados sin estímulo (SE) o en presencia del agonista del BCR (α -BCR), del tlr9 (CpG) o del CD40 (CD40L). Se muestra la relación entre la concentración de IL-10 secretada por linfocitos B estimulados vía BCR, TLR9 o CD40L y el tipo ES manifestada en los pacientes, limitada o difusa.

8. Discusión

El rol de los linfocitos B en enfermedades autoinmunes ha sido principalmente comprendido como patogénico, responsables de la secreción de autoanticuerpos, de la activación de otros tipos celulares hacia un perfil inmunogénico y de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. A lo largo de los últimos años, varios investigadores se han centrado en el rol regulador que los linfocitos B podrían tener en un contexto de autoinmunidad. Es así como se han descrito mecanismos desplegados por linfocitos B capaces de prevenir o suprimir respuestas inmunes. Estos mecanismos involucran la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-4, la inducción de anergia en linfocitos T efectores y la generación de linfocitos T reguladores (Yang et al., 2013). Esta capacidad de secretar IL-10 y la frecuencia de estos linfocitos B ha sido foco de diversos estudios y se ha vuelto una componente importante a la hora de comprender los mecanismos humorales y celulares por los cuales se genera la pérdida de tolerancia característica de enfermedades autoinmunes. Es en esta pérdida de tolerancia donde también se ha evidenciado que alteraciones en la expresión y función del receptor inhibitor FcγIIb en linfocitos B se relacionan con el desarrollo y severidad de enfermedades autoinmunes (Blank et al., 2005; Catalán et al., 2010; Floto et al., 2005).

En este trabajo se caracterizó la frecuencia de los linfocitos B secretores de IL-10 y su capacidad de producir y secretar esta citoquina. También se estudió la expresión y función del receptor FcγIIb y el posible mecanismo involucrado en la pérdida de tolerancia en pacientes con ES.

Al analizar por citometría de flujo las muestras de pacientes y controles provenientes de sangre periférica podemos notar un aumento en el porcentaje de células CD19⁺ en los pacientes con ES, resultado similar al obtenido previamente por

Sato y colaboradores (Sato et al., 2004). Este elevado porcentaje puede ser atribuido como consecuencia de la enfermedad. Interesantemente y siendo la primera evidencia existente en esta enfermedad se observó además un elevado porcentaje de linfocitos B transicionales. Resultados similares se han evidenciado en otras enfermedades autoinmunes como SLE y en el síndrome de Sjögren (Lin et al., 2014; Sims et al., 2005). Dado que en esta población se encuentran los linfocitos B reguladores, su aumento se puede deber a un mecanismo de compensación homeostático para contrarrestar el ambiente inflamatorio que se desarrolla en la enfermedad. Además se observó una disminución en la población de linfocitos B de memoria, posiblemente debido a la migración de estas células a los sitios de inflamación y a una gran conversión de esta población a células plasmáticas. La subpoblación de linfocitos B vírgenes está ligeramente aumentada en pacientes, lo que es atribuible a la repoblación de linfocitos B en respuesta a la disminución de la subpoblación de memoria circulante.

La expresión del receptor inhibidor FcγIIb presentó un perfil alterado en los pacientes con ES, como podemos observar figura 6. La subpoblación de linfocitos B transicionales evidenció una elevada expresión de este receptor. No hay evidencia de la expresión aumentada de este receptor en la población transicional en otras enfermedades autoinmunes. En otros estudios en enfermedades autoinmunes, como RA y SLE, se ha visto una reducida expresión de este receptor en la subpoblación de memoria y esto asociado con altos niveles de autoanticuerpos (Catalán et al., 2010; Isaák et al., 2008; Su et al., 2004). Este fenómeno no fue observado en este trabajo. A pesar de que se ha descrito la presencia de FcγRIIb en linfocitos B transicionales, su función permanece desconocida en esta subpoblación (Sims et al., 2005). En una reciente publicación, se caracterizó en ratones una subpoblación de linfocitos B secretora de IL-10 que expresa altos niveles de FcγRIIb, que facilita la captura y

endocitosis de complejos inmunes atenuando la activación de la respuesta inmunes e inhibiendo la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (Qian et al., 2012). El posible mecanismo de cómo estaría involucrada una elevada expresión de FcγRIIb en los linfocitos B transicionales en la patogenia de ES se expone más adelante.

Si bien todos los estímulos inducen la producción de IL-10, los linfocitos B de las pacientes con ES presentan una disminuida capacidad de producir esta citoquina, en células sin estimular, estimuladas vía BCR y vía TLR9. En cuanto a la secreción de IL-10, sólo fue posible observar una reducida secreción de IL-10 en las células B de pacientes ES sin estimular, resultado relevante, dado que se ha postulado que las Bregs circulantes serían capaces de secretar IL-10 de forma espontánea, sin estímulo previo, siendo una población que poseería esta citoquina almacenada en vesículas en su interior. Esta disminución en la secreción de IL-10 ha sido observada en otras enfermedades autoinmunes (Blair et al., 2010; Flores-Borja et al., 2013). Sin embargo futuros análisis funcionales, como ensayos de supresión de la proliferación de linfocitos T, son necesarios para comprender mejor el rol de esta población en ES.

Es importante señalar que el la estimulación del BCR en conjunto con el TLR9 y la estimulación del CD40 son estímulos muy fuertes, pudiendo anular diferencias entre pacientes y controles sanos, sin embargo, no nos fue posible ajustar las concentraciones tan avanzado el estudio. Otra información a tener en consideración es la baja secreción de IL-10 asociada a la estimulación del TLR9 observada en este estudio. Postulamos que fenómeno está relacionado al almacenaje de los linfocitos B tanto de pacientes como de controles, dado que experimentos de estimulación en linfocitos B recién aislados presentan niveles altos de secreción de IL-10 (datos no mostrados).

La secreción y producción de IL-10 mediada por la activación del BCR fue inhibida eficientemente por nuestra estrategia, al utilizar fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor. Como pudimos observar tanto pacientes como controles presentan inhibición en la secreción y producción de IL-10 mediada por la activación del FcγRIIb. Interesantemente, la inhibición de la producción sólo se observa en la población transicional. A pesar de ser la población que más produce IL-10, la función inhibitoria del receptor es superior que en las poblaciones virgen y de memoria. Futuros análisis con subpoblaciones aisladas por sorting celular son necesarios para corroborar estos resultados.

Al comparar pacientes con controles se observó que los linfocitos B de pacientes con ES presentan una inhibición elevada de la producción de IL-10, y que esta inhibición es aún más exacerbada en la población transicional (Fig. 11). Coincidente con este resultado es el hecho que es esta población la que mostraba niveles elevados de expresión de este receptor (Fig. 6C). No hay evidencias de cómo un incremento en la expresión de FcγRIIb en la subpoblación transicional pueda estar involucrada en las alteraciones observadas en los linfocitos B de pacientes con ES. Sin embargo con esta información se puede explicar un posible mecanismo asociado a esta enfermedad en el cual los linfocitos B transicionales, que son los principales secretores de IL-10, al expresar altos niveles del receptor inhibitor FcγRIIb, poseerían una disminuida capacidad de secretar IL-10 después de la unión de complejos inmunes conteniendo autoanticuerpos, existiendo así una alteración en un posible ciclo regulador. Futuros ensayos en la capacidad de estos linfocitos en secretar otras citoquinas, pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, son necesarios para comprender si la señal inhibitoria gatillada por este receptor, inhibe diferencialmente los perfiles de citoquinas, pudiendo generar un desbalance homeostático aún mayor en el paciente. A su vez, ensayos de

inhibición de la proliferación de linfocitos T, co-cultivados con linfocitos B de pacientes, son necesario para comprobar si esta disminución exacerbada en la producción de IL-10 conlleva a deficiencias funcionales.

No fue posible lograr encontrar relación entre los parámetros intrínsecos medidos en los linfocitos B y la severidad de la enfermedad. Es posible que esto sea debido a la distribución del tipo de ES presentada por los pacientes, dado que la forma difusa, al ser menos frecuente, hizo que los análisis fueran muy dispares en cuanto a la cantidad de individuos. En cuanto a la separación por el promedio del puntaje de Rodnan, no se tenían los puntajes de todos los pacientes, disminuyendo la fuerza de los test estadísticos, sin embargo existen tendencias en los análisis pero probablemente un mayor número de pacientes reclutados pudiese esclarecer este fenómeno.

9. Conclusiones

- Los pacientes con ES presentan una elevada frecuencia de la población transicional de linfocitos B en sangre periférica.
- La población transicional de los pacientes con ES presenta una expresión aumentada del receptor FcγRIIb.
- Los linfocitos B de pacientes con ES presentan una disminuida secreción de IL-10 en comparación a los controles sanos.
- Los linfocitos B de pacientes con ES y controles presentan una inhibición de la producción y secreción de IL-10 mediada por el receptor FcγRIIb.
- Los fragmentos Fc agregados por calor inhiben de mejor forma la producción de IL-10 en los linfocitos B de los pacientes con ES, principalmente en la población transicional, coincidentemente con su elevada expresión del receptor FcγRIIb.

10. Bibliografía

- Abraham, D., and J. Varga. 2005. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends in immunology* 26:587-595.
- American-Rheumatism-Association. 1980. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis and rheumatism* 23:581-590.
- Black, C., M. Matucci-Cerinic, and L. Guillevin. 2009. Progress in systemic sclerosis: a 10-year perspective. *Rheumatology (Oxford, England)* 48 Suppl 3:2.
- Blair, P., L. Noreña, F. Flores-Borja, D. Rawlings, D. Isenberg, M. Ehrenstein, and C. Mauri. 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 32:129-140.
- Blair, P.A., K.A. Chavez-Rueda, J.G. Evans, M.J. Shlomchik, A. Eddaoudi, D.A. Isenberg, M.R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2009. Selective Targeting of B Cells with Agonistic Anti-CD40 Is an Efficacious Strategy for the Generation of Induced Regulatory T2-Like B Cells and for the Suppression of Lupus in MRL/lpr Mice. *The Journal of Immunology* 182:3492-3502.
- Blank, M.C., R.N. Stefanescu, E. Masuda, F. Marti, P.D. King, P.B. Redecha, R.J. Wurzbarger, M. Peterson, S. Tanaka, and L. Pricop. 2005. Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Human Genetics* 117:220-227.
- Bolland, S., and J. Ravetch. 2000. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13:277-285.
- Bosello, S., M. De Santis, G. Lama, C. Spanò, C. Angelucci, B. Tolusso, G. Sica, and G. Ferraccioli. 2010. B cell depletion in diffuse progressive systemic sclerosis: safety, skin score modification and IL-6 modulation in an up to thirty-six months follow-up open-label trial. *Arthritis research & therapy* 12:
- Bouaziz, J.D., S. Calbo, M. Maho-Vaillant, A. Saussine, M. Bagot, A. Bensussan, and P. Musette. 2010. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. *European Journal of Immunology* 40:2686-2691.
- Carter, N.A., E.C. Rosser, and C. Mauri. 2012. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 14:
- Carter, N.A., R. Vasconcellos, E.C. Rosser, C. Tulone, A. Muñoz-Suano, M. Kamanaka, M.R. Ehrenstein, R.A. Flavell, and C. Mauri. 2011. Mice Lacking Endogenous IL-10-Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 186:5569-5579.
- Catalán, D., O. Aravena, F. Sabugo, P. Wurmman, L. Soto, A. Kalergis, M. Cuchacovich, J. Aguillón, I. Millenium Nucleus on, and P.F. Immunotherapy. 2010. B cells from rheumatoid arthritis patients show important alterations in the expression of CD86 and FcgammaRIIb, which are modulated by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis research & therapy* 12:
- Clements, P., P. Lachenbruch, J. Siebold, B. White, S. Weiner, R. Martin, A. Weinstein, M. Weisman, M. Mayes, and D. Collier. 1995. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology* 22:1281-1285.

- Colotta, F., A. Borré, J. Wang, M. Tattaneli, F. Maddalena, N. Polentarutti, G. Peri, and A. Mantovani. 1992. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148:760-765.
- Czömpöly, T., D. Simon, L. Czirják, and P. Németh. 2009. Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 8:692-696.
- Charles, C., P. Clements, and D. Furst. 2006. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet* 367:1683-1691.
- Duddy, M., M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, H. Atkins, H. Kim, and A. Bar-Or. 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178:6092-6099.
- Duncan, M.R., and B. Berman. 1991. Stimulation of Collagen and Glycosaminoglycan Production in Cultured Human Adult Dermal Fibroblasts by Recombinant Human Interleukin 6. *Journal of Investigative Dermatology* 97:686-692.
- Enyedy, E., J. Mitchell, M. Nambiar, and G. Tsokos. 2001. Defective FcγRIIb1 signaling contributes to enhanced calcium response in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 101:130-135.
- Evans, J.G., K.A. Chavez-Rueda, A. Eddaoudi, A. Meyer-Bahlburg, D.J. Rawlings, M.R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178:7868-7878.
- Fillatreau, S., C.H. Sweeney, M.J. McGeachy, D. Gray, and S.M. Anderton. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology* 3:944-950.
- Fleming, J., and S. Schwartz. 2008. The pathology of scleroderma vascular disease. *Rheumatic diseases clinics of North America* 34:41.
- Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M. Ehrenstein, D. Isenberg, and C. Mauri. 2013. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science translational medicine* 5:
- Floto, R., M. Clatworthy, K. Heilbronn, D. Rosner, P. MacAry, A. Rankin, P. Lehner, W. Ouweland, J. Allen, N. Watkins, and K. Smith. 2005. Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nature medicine* 11:1056-1058.
- Gabrielli, A., E. Avvedimento, and T. Krieg. 2009. Scleroderma. *The New England journal of medicine* 360:1989-2003.
- Gillery, P., H. Serpier, M. Polette, G. Bellon, C. Clavel, Y. Wegrowski, P. Birembaut, B. Kalis, R. Cariou, and F. Maquart. 1992. Gamma-interferon inhibits extracellular matrix synthesis and remodeling in collagen lattice cultures of normal and scleroderma skin fibroblasts. *European journal of cell biology* 57:244-253.
- Hasegawa, M. 2010. B lymphocytes: Shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis. *The Journal of Dermatology* 37:3-10.
- Hitomi, Y., N. Tsuchiya, M. Hasegawa, M. Fujimoto, K. Takehara, K. Tokunaga, and S. Sato. 2007. Association of CD22 gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens* 69:242-249.
- Hsieh, C.S., A.B. Heimberger, J.S. Gold, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:6065-6069.
- Ihn, H., K. Yamane, M. Kubo, and K. Tamaki. 2001. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen

- synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis and rheumatism* 44:474-480.
- Isaák, A., P. Gergely, Z. Szekeres, J. Prechl, G. Poór, A. Erdei, and J. Gergely. 2008. Physiological up-regulation of inhibitory receptors FcγRII and CR1 on memory B cells is lacking in SLE patients. *International Immunology* 20:185-192.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D.J. DiLillo, K. Yanaba, G.M. Venturi, P.M. Szabolcs, S.H. Bernstein, C.M. Magro, A.D. Williams, R.P. Hall, W.E. Clair, and T.F. Tedder. 2011. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117:530-541.
- Kalogerou, A., E. Gelou, S. Mountantonakis, L. Settas, E. Zafiriou, and L. Sakkas. 2005. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases* 64:1233-1235.
- Koenig, M., M. Dieudé, and J.-L. Senécal. 2008. Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmunity reviews* 7:588-593.
- Kono, H., C. Kyogoku, T. Suzuki, N. Tsuchiya, H. Honda, K. Yamamoto, K. Tokunaga, and Z.-I. Honda. 2005. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Human molecular genetics* 14:2881-2892.
- Kurasawa, K., K. Hirose, H. Sano, H. Endo, H. Shinkai, Y. Nawata, K. Takabayashi, and I. Iwamoto. 2000. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 43:2455-2463.
- Kuwana, M., T.A. Medsger, and T.M. Wright. 1995. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155:2703-2714.
- Lafyatis, R., E. Kissin, M. York, G. Farina, K. Viger, M.J. Fritzler, P.A. Merkel, and R.W. Simms. 2009. B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 60:578-583.
- Lee, C., R. Homer, Z. Zhu, S. Lanone, X. Wang, V. Koteliansky, J. Shipley, P. Gotwals, P. Noble, Q. Chen, R. Senior, and J. Elias. 2001. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *The Journal of experimental medicine* 194:809-821.
- Lee, K., Y. Ro, Y. Ryoo, H. Kwon, and J. Song. 1996. Regulation of interleukin-4 on collagen gene expression by systemic sclerosis fibroblasts in culture. *Journal of dermatological science* 12:110-117.
- LeRoy, E., C. Black, R. Fleischmajer, S. Jablonska, T. Krieg, T. Medsger, N. Rowell, and F. Wollheim. 1988. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *The Journal of rheumatology* 15:202-205.
- LeRoy, E., and T. Medsger. 2001. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology* 28:1573-1576.
- Levy, Y., H. Amital, P. Langevitz, F. Nacci, A. Righi, L. Conforti, S. Generini, M. Cerinic, and Y. Shoenfeld. 2004. Intravenous immunoglobulin modulates cutaneous involvement and reduces skin fibrosis in systemic sclerosis: An open-label study. *Arthritis & Rheumatism* 50:1005-1007.
- Lin, W., L. Jin, H. Chen, Q. Wu, Y. Fei, W. Zheng, Q. Wang, P. Li, Y. Li, W. Zhang, Y. Zhao, X. Zeng, and F. Zhang. 2014. B cell subsets and dysfunction of regulatory B cells in IgG4-related diseases and primary Sjögren's syndrome: the similarities and differences. *Arthritis Research & Therapy* 16:

- Mackay, M., A. Stanevsky, T. Wang, C. Aranow, M. Li, S. Koenig, J. Ravetch, and B. Diamond. 2006. Selective dysregulation of the FcγRIIB receptor on memory B cells in SLE. *The Journal of experimental medicine* 203:2157-2164.
- Mann, M.K., K. Maresz, L.P. Shriver, Y. Tan, and B.N. Dittel. 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178:3447-3456.
- Mason, D. 1996. The role of B cells in the programming of T cells for IL-4 synthesis. *The Journal of Experimental Medicine* 183:717-719.
- Matsushita, T., M. Hasegawa, K. Yanaba, M. Kodera, K. Takehara, and S. Sato. 2006. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis & Rheumatism* 54:192-201.
- Mauri, C., D. Gray, N. Mushtaq, and M. Londei. 2003. Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 197:489-501.
- Mayes, M. 2003. Scleroderma epidemiology. *Rheumatic diseases clinics of North America* 29:239-254.
- Medsger, T., A. Silman, V. Steen, C. Black, A. Akesson, P. Bacon, C. Harris, S. Jablonska, M. Jayson, S. Jimenez, T. Krieg, E. Leroy, P. Maddison, M. Russell, R. Schachter, F. Wollheim, and H. Zachariae. 1999. A disease severity scale for systemic sclerosis: development and testing. *The Journal of rheumatology* 26:2159-2167.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R.S. Blumberg, and A.K. Bhan. 2002. Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity* 16:219-230.
- Nihtyanova, S., G. Brough, C. Black, and C. Denton. 2007. Mycophenolate mofetil in diffuse cutaneous systemic sclerosis--a retrospective analysis. *Rheumatology (Oxford, England)* 46:442-445.
- Nimmerjahn, F., and J. Ravetch. 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24:19-28.
- Nishijima, C., I. Hayakawa, T. Matsushita, K. Komura, M. Hasegawa, K. Takehara, and S. Sato. 2004. Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clinical & Experimental Immunology* 138:357-363.
- Okano, Y. 1996. ANTINUCLEAR ANTIBODY IN SYSTEMIC SCLEROSIS (SCLERODERMA). *Rheumatic Disease Clinics of North America* 22:709-735.
- Poole, J., and V. Steen. 1991. The use of the Health Assessment Questionnaire (HAQ) to determine physical disability in systemic sclerosis. *Arthritis care and research : the official journal of the Arthritis Health Professions Association* 4:27-31.
- Prescott, R., A. Freemont, C. Jones, J. Hoyland, and P. Fielding. 1992. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *The Journal of pathology* 166:255-263.
- Qian, L., C. Qian, Y. Chen, Y. Bai, Y. Bao, L. Lu, and X. Cao. 2012. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcyIIbhi regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood* 120:581-591.
- Ramos-Casals, M., V. Fonollosa-Pla, P. Brito-Zerón, and A. Sisó-Almirall. 2010. Targeted therapy for systemic sclerosis: how close are we? *Nature reviews. Rheumatology* 6:269-278.

- Rincón, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig, and R.A. Flavell. 1997. Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4+ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 185:461-470.
- Rojas-Serrano, J. 2006. [Epidemiology. Ethnic differences in systemic sclerosis]. *Reumatología clínica* 2 Suppl 3:5.
- Sakkas, L., I. Chikanza, and C. Platsoucas. 2006. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nature clinical practice. Rheumatology* 2:679-685.
- Sakkas, L., and C. Platsoucas. 2004. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis and rheumatism* 50:1721-1733.
- Sakkas, L., C. Tourtellotte, S. Berney, A. Myers, and C. Platsoucas. 1999. Increased levels of alternatively spliced interleukin 4 (IL-4delta2) transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 6:660-664.
- Sato, S., M. Fujimoto, M. Hasegawa, and K. Takehara. 2004. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis & Rheumatism* 50:1918-1927.
- Sato, S., M. Hasegawa, M. Fujimoto, T.F. Tedder, and K. Takehara. 2000. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165:6635-6643.
- Shimomura, Y., E. Mizoguchi, K. Sugimoto, R. Kibe, Y. Benno, A. Mizoguchi, and A.K. Bhan. 2008. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. *International Immunology* 20:729-737.
- Sims, G., R. Ettinger, Y. Shirota, C. Yarboro, G. Illei, and P. Lipsky. 2005. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105:4390-4398.
- Stockinger, B., T. Zal, A. Zal, and D. Gray. 1996. B cells solicit their own help from T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 183:891-899.
- Su, K., J. Wu, J. Edberg, X. Li, P. Ferguson, G. Cooper, C. Langefeld, and R. Kimberly. 2004. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing FcgammaRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B polymorphisms and their association with systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172:7186-7191.
- Sun, C.-M., E. Deriaud, C. Leclerc, and R. Lo-Man. 2005. Upon TLR9 Signaling, CD5+ B Cells Control the IL-12-Dependent Th1-Priming Capacity of Neonatal DCs. *Immunity* 22:467-477.
- Tackenberg, B., I. Jelčić, A. Baerenwaldt, W.H. Oertel, N. Sommer, F. Nimmerjahn, and J.D. Lünemann. 2009. Impaired inhibitory Fcγ receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:4788-4792.
- Tan, F.K., F.C. Arnett, S. Antohi, S. Saito, A. Mirarchi, H. Spiera, T. Sasaki, O. Shoichi, K. Takeuchi, J.P. Pandey, R.M. Silver, C. LeRoy, A.E. Postlethwaite, and C.A. Bona. 1999. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1, in patients with scleroderma and other connective tissue diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163:1066-1072.
- Whitfield, M.L., D.R. Finlay, J. Murray, O.G. Troyanskaya, J.-T. Chi, A. Pergamenschikov, T.H. McCalmont, P.O. Brown, D. Botstein, and K.M. Connolly. 2003. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:12319-12324.

- Wolf, S.D., B.N. Dittel, F. Hardardottir, and C.A. Janeway. 1996. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induction in Genetically B Cell-deficient Mice. *The Journal of Experimental Medicine* 184:2271-2278.
- Yanaba, K., J.-D. Bouaziz, K.M. Haas, J.C. Poe, M. Fujimoto, and T.F. Tedder. 2008. A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* 28:639-650.
- Yanaba, K., J.-D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata, and T.F. Tedder. 2009. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *The Journal of Immunology* 182:7459-7472.
- Yang, M., K. Rui, S. Wang, and L. Lu. 2013. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cellular & Molecular Immunology* 10:122-132.
- Yuasa, T., S. Kubo, T. Yoshino, A. Ujike, K. Matsumura, M. Ono, J. Ravetch, and T. Takai. 1999. Deletion of fcγ receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *The Journal of experimental medicine* 189:187-194.
- Zheng, J., Y. Liu, Y.-L. Lau, and W. Tu. 2010. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4+ regulatory T cells. *Cellular & Molecular Immunology* 7:44-50.

11. Anexo



CONSENTIMIENTO INFORMADO

29 AGO 2011

Título del proyecto: "Receptores Fc gamma y células B reguladoras: una novedosa red detrás de la respuesta inmune que dirige la Esclerosis Sistémica"

Grupo Individuos sanos

Investigador Principal: Dra. Lillian Soto Sáez, Sección de Reumatología, Depto. De Medicina Fono: 9788236

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación lea atentamente este formulario.

Se me ha invitado a participar como control sano del estudio "Receptores Fc gamma y células B reguladoras: una novedosa red detrás de la respuesta inmune que dirige la Esclerosis Sistémica". Esta investigación estudiara los Linfocitos B, células del sistema inmune presentes en la sangre. Se recolectaran muestras de 26 pacientes con Esclerosis Sistémica y 26 de individuos sanos. Con los conocimientos resultantes de esta investigación, se logrará comprender alguno de los mecanismos que llevan a las manifestaciones que caracterizan a esta enfermedad, la que hasta el momento cuenta con muy escaso tratamiento.

Mi participación implica que debo concurrir al Hospital Clínico de la Universidad de Chile, donde se me extraerán 60 ml de sangre venosa, equivalente a 4 cucharadas, para estudiar los Linfocitos B presentes en ella. Se estudiara el material genético de estos Linfocitos. La realización de este procedimiento puede suponer el gasto de tiempo necesario para su realización, dolor y, eventualmente, equimosis (moretón) en el sitio de punción en el sitio de punción. Aparte de las molestias descritas, mi participación en este estudio no conlleva riesgos importantes para mi salud.

Se me ha informado que todas las muestras serán identificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Es posible que los resultados derivados de esta investigación sean divulgados en congresos y revistas científicas, siempre manteniendo en reserva la

Hospital Clínico Universidad de Chile

identidad de los individuos participantes. Tengo derecho a recibir toda la información en lo referente a los resultados derivados de mi participación en el estudio en forma oportuna, si así yo lo solicitase.



29 AGO 2011

Se me ha informado que no recibiré ningún beneficio médico o compensación económica por participar en el estudio. Sin embargo, estoy en conocimiento que mi participación aportara en forma significativa al desarrollo de la ciencia pudiendo beneficiar con esto a futuras generaciones de pacientes.

Se me ha informado que mi participación es voluntaria y no me representará gastos adicionales ni a mí ni a mi sistema de salud, ni perderé ninguno de mis derechos o beneficios actuales en el caso que decidiera no participar.

Dado que los procedimientos a realizar son de bajo riesgo es poco probable que presente consecuencias en mi salud. En caso de presentar alguna complicación como consecuencia de la participación en este estudio, tomaré contacto con la Dra. Lilian Soto Sáez, quien quedará a cargo del manejo médico de ésta.

Se me ha informado que parte de mi muestra de sangre se congelará y se almacenara para estudios futuros que puedan surgir, siempre y cuando estos estén relacionados con la línea principal de esta investigación.

Estoy además en conocimiento que de no participar en este estudio o si deseo retirarme de este, esto no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte de este Hospital o del equipo médico que participa en esta investigación.

Por último, he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré de mi interés; las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de cabecera o tratante, familia o pedir la opinión de otro profesional sobre mi participación en este estudio. Entiendo se me dará una copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación.

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o experimenta cualquier problema puede comunicarse con:

Hospital Clínico Universidad de Chile

Dra. Lilian Soto Saez Al teléfono: 9788236 o celular 93356958



Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Chile, cualquier consulta llamar al 9789008. 29 AGO. 2011

Nombre del participante:

RUT: Firma: Fecha:

Nombre del Investigador o medico designado:

Rut: Firma: Fecha:

Nombre Ministro de Fe o delegado:

Rut: Firma: Fecha:

CONSENTIMIENTO INFORMADO



Título del proyecto: "Receptores Fc gamma y células B reguladoras: una novedosa red detrás de la respuesta inmune que dirige la Esclerosis Sistémica"

Grupo Esclerosis Sistémica

Investigador Principal: Dra. Lilian Soto Sáez, Sección de Reumatología, Depto. De Medicina Fono: 9788236

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación lea atentamente este formulario.

Se me ha informado que padezco una enfermedad llamada Esclerosis Sistémica y se me ha invitado a participar del estudio "Receptores Fc gamma y células B reguladoras: una novedosa red detrás de la respuesta inmune que dirige la Esclerosis Sistémica". Esta investigación estudiara los linfocitos B, células del sistema inmune presentes en la sangre. Se recolectaran muestras de 26 pacientes con Esclerosis Sistémica y 26 individuos sanos. Con los conocimientos resultantes de esta investigación, se logrará comprender alguno de los mecanismos que llevan a las manifestaciones que caracterizan a esta enfermedad, la que hasta el momento cuenta con muy escaso tratamiento.

MI participación implica que debo concurrir al Hospital Clínico de la Universidad de Chile en al menos en 2 ocasiones, en las cuáles se me realizarán evaluaciones clínicas y los siguientes exámenes de laboratorio: exámenes de sangre para estudiar los linfocitos B y su material genético, además de otros parámetros bioquímicos, para lo que se necesitará extraer 60 ml de sangre, equivalente a 4 cucharadas; radiografía de tórax; capilaroscopia; electrocardiograma; ecocardiograma; espirometría y manometría esofágica. Además tendré que contestar 3 encuestas de 7 minutos de duración dirigidas a conocer la intensidad de algunos síntomas. La realización de estos exámenes puede suponer el gasto de tiempo necesario para su realización, dolor y, eventualmente, equimosis (moreton) en el sitio de punción para extraer sangre venosa, acto que se llevará a cabo en dos ocasiones. Así también puede experimentarse disconfort para tragar la sonda

Hospital Clínico Universidad de Chile:

esofágica requerida en el examen de manometría y un esfuerzo respiratorio forzado para realizar la espirometría. Aparte de las molestias descritas, la realización de estas evaluaciones no conlleva riesgos importantes para mi salud.

29 AGO 2011



Se me ha informado que todas las muestras o resultados de exámenes serán identificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Es posible que los resultados derivados de esta investigación sean divulgados en congresos y revistas científicas, siempre manteniendo en reserva la identidad de los individuos participantes. Tengo derecho a recibir toda la información en lo referente a los resultados derivados de mi participación en el estudio en forma oportuna, si así yo lo solicitase.

Se me ha informado que no recibiré ningún beneficio médico o compensación económica por participar en el estudio. Sin embargo, estoy en conocimiento que mi participación aportará en forma significativa al desarrollo de la ciencia pudiendo beneficiar con esto a futuras generaciones de pacientes.

Se me ha informado que mi participación es voluntaria y no me representará gastos adicionales ni a mí ni a mi sistema de salud, ni perderé ninguno de mis derechos o beneficios actuales en el caso que decidiera no participar o retirarme del estudio.

Dado que los procedimientos a realizar son de bajo riesgo es poco probable que presente consecuencias en mi salud. En caso de presentar alguna complicación como consecuencia de la participación en este estudio, tomaré contacto con la Dra. Lilian Soto Sáez, quien quedará a cargo del manejo médico de ésta.

Se me ha solicitado que parte de mi muestra de sangre sea congelada y almacenada para estudios futuros que puedan surgir, siempre y cuando estos estén relacionados con la línea principal de esta investigación.

Estoy además en conocimiento que de no participar en este estudio o si deseo retirarme de éste, esto no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte de este Hospital o del equipo médico que participa en esta investigación.

29 AGO 2011



Por último, he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré de mi interés, las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de cabecera o tratante, familia o pedir la opinión de otro profesional de mi participación en este estudio. Entiendo se me dará una copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación.

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o experimenta cualquier problema puede comunicarse con:

Dra. Lillian Soto Sáez Al teléfono: 9788236 o celular 93356958

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Chile, cualquier consulta llamar al 9789008.

Nombre del participante:

RUT: Firma: Fecha:

Nombre del Investigador o médico designado:

Rut: Firma: Fecha:

Nombre Ministro de Fe o delegado:

Rut: Firma: Fecha:

Hospital Clínico Universidad de Chile