

**Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado**



**Rol de Siglec 2 y Siglec 10 en la atenuación de la
expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B
humanos**

JORGE ALEJANDRO BERENDSEN MELLA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION INMUNOLOGÍA**

**DIRECTORES DE TESIS: DR. DIEGO CATALÁN M.
PROF. DR. JUAN CARLOS AGUILLÓN G.**

2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magister presentada por el candidato**

JORGE ALEJANDRO BERENDSEN MELLA

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para
optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en inmunología
en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 25 de Mayo del 2016.**

Dr. Diego Catalán M.
Director de Tesis

Prof. Dr. Juan Carlos Aguillón G.
Co-Director de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Dra. Andrea Soza

Dr. Mario Galindo

Dra. Karina Pino

Prof. Dr. Arturo Ferreira
Presidente Comisión

DEDICATORIA

Dedicada a mis profesores, colegas, tutores por todos los momentos destinados a mi formación
y fortalecimiento de valores.

Por su puesto a mis amigos que sin ellos no hubiera tenido la alegría y la energía para terminar
mi trabajo.

Dedicado a mi familia, la razón de lo que hoy en día soy, esta tesis es el resultado de lo que
me han enseñado en la vida, siempre me inculcaron la honestidad, el amor por tu trabajo, y
que el mejor resultado es el sacrificio por ser el mejor ya que será tu éxito del mañana.

Gracias a todos por confiar en mí y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar expresando mi reconocimiento y agradecimiento al profesor Dr. Diego Catalán, que ha sido un gran ejemplo para mí. Me gustaría darle las gracias por permitirme crecer como científico, siendo crítico a cada momento, con la única intención que yo sea mejor. Sus consejos tanto en la investigación, así como en mi formación de Magister en Inmunología han sido de gran valor.

También me gustaría dar las gracias a los miembros del comité, Dra. Andrea Soza., Dr. Mario Galindo. Dra. Karina Pino, Dr. Arturo Ferreira y también al Dr. Juan Carlos Aguillón como cotutor, por servir en mi formación y guiarme con sus brillantes comentarios y sugerencias durante todo el transcurso de mi tesis.

También me gustaría dar las gracias a los médicos, enfermeras y auxiliares de enfermería en la unidad de toma de muestra de sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile porque sin ellos y su labor esta tesis no hubiera podido ser ejecutada.

Por su puesto agradecer a todo el centro de inmunobiotecnología y los gratos momentos que compartimos en congresos u otras actividades de distención, en especial a Alex Aravena, Ashley Ferrier, por su constante apoyo científico en los experimentos, a Alvaro Rojas y Nancy Fabregas, por todos los momentos que me acompañó al citómetro y preparación de reactivos respectivamente, y muchas personas más que fueron parte de la alegría diaria y formación.

Finalmente, un agradecimiento especial a mi familia. Todos esos momentos en que me apoyaron con el solo hecho de permitirme no hacer ningún quehacer doméstico porque estaba estudiando. Entenderme cuando no podía asistir a eventos familiares porque tenía que hacer experimentos. A todos ustedes gracias, ya que sin ustedes no hubiera podido.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	13
IL-10, una citoquina pleiotrópica	14
Ligandos que estimulan la producción de IL-10 en células B	16
Vías de señalización responsables de la producción de IL-10 en el sistema inmune	16
Lectinas tipo inmunoglobulinas que unen ácido siálico (Siglecs)	18
Siglec 2/CD22	21
Siglec 10/SiglecG	22
Inmunoglobulinas como ligandos de Siglecs	24
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
1.- Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en las poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria y transicionales.	28
Donantes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	28
Evaluación de la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B en reposo	29
2.- Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40.	29
Evaluación de la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados	29
Activación de la producción de IL-10 en linfocitos B humanos	30
3.- Medir la expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B estimulados vía BCR, TLR9 y CD40, en presencia de un agonista para Siglec 2 y Siglec 10.	31
Evaluación de la función de Siglec 2 y Siglec 10 sobre la expresión de IL-10 en linfocitos B	31

Análisis estadísticos	32
RESULTADOS	33
Objetivo específico 1: Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en las poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria y transicionales.	33
Siglec 2 y Siglec 10 se expresan en poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria y transicionales en reposo.	33
Objetivo específico 2: Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40.	35
Siglec 2 y Siglec 10 aumentan su expresión en linfocitos B activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40.	35
La mayor frecuencia de células B productoras de IL-10 se encuentra contenida en la subpoblación de linfocitos B transicionales.	39
Fragmento cristalizante (Fc) de IgG humana disminuye la expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B.	41
Siglec 2 y Siglec 10 modulan la secreción y expresión de IL-10 en linfocitos B activados.	43
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	70
CONSENTIMIENTO INFORMADO	76
ACTA DE APROBACIÓN POR COMITÉS DE ÉTICA	79
PUBLICACIONES	83
RESUMEN DE TRABAJOS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	92

ABREVIATURAS

AP: Proteína activadora (Activator protein)

APCs: Células presentadoras de antígenos (Antigen-presenting cells)

AR: Artritis reumatoide

Asp: Aminoácido Asparragina

BCR: Receptor de antígenos del linfocito B (B-cell receptor)

BLNK: Molécula adaptadora *B cell linker*

Bregs: Linfocitos B reguladores

BTK: Tirosina-quinasa de Bruton (Bruton's tyrosine kinase)

Ca⁺²: Calcio

CD: Grupo de diferenciación (Cluster of differentiation)

CSIF: Factor inhibidor de la síntesis de citoquinas (Cytokine synthesis inhibitory factor)

DAMPS: Patrones moleculares asociado a daño (Damage-associated molecular pattern molecules)

DCs: Células dendríticas (Dendritics cells)

ELISA: Ensayo de inmuno absorción enzimática (Enzymed-linked immunosorbent assay)

FACS: Citometría de flujo (Fluorescence-activated cell sorting)

Fc: Fragmento cristalizable

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (Granulocytes and monocytes colony stimulating factor)

GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol (Glycosylphosphatidylinositol)

Ig. Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

IP₃: inositol-trisfosfato)

ITAM: Inmunoreceptores con motivos activadores de tirosina (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

ITIM: Inmunoreceptores con motivos inhibitorios de tirosina (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)

IVIg: Inmunoglobulina intravenosa

JAK: Quinasa Janus (Janus Kinase)

JNK: Quinasa N-terminal Jun (Jun N-terminal Kinase)

LES: Lupus eritematoso sistémico

LPS: Lipopolisacárido

MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinases)

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (Major histocompatibility complex)

MyD88: Proteína adaptadora de respuesta primaria de la diferenciación mieloide 88 (Myeloid differentiation factor 88)

NF- κ B: Factor nuclear kappa B (Nuclear factor kappa B)

NFAT: Factor nuclear de células T activadas (Nuclear factor of activated T-cells)

NK: Célula asesina natural (Natural Killer cell)

ODN: oligodeoxinucleótidos

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral blood mononuclear cells)

PBS: Tampón de fosfato salino (Phosphate buffered saline)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)

PI3K: Fosfoinositido-3 quinasa (Phosphatidylinositol-3 Kinase)

PKC: Proteína quinasa C (Protein kinase C)

PLC γ : Fosfolipasa-C γ (Phospholipase-C γ)

PMA: Forbol-acetato-miristato (Phorbol myristate acetate)

PTI: Púrpura trombocitopénica idiopática

SHIP: Fosfatasa homóloga a Src que contiene inositol (Src homology-containing inositol phosphatase)

SHP: Fosfatasa homóloga a Src (Src homology phosphatase)

Siglec: Lectina tipo inmunoglobulina que une ácido sialico (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin)

SOCs: Moléculas supresoras de señalización de citoquinas (Suppressors-of-cytokine-signaling molecules)

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción (Signal transducer and activator of transcription)

TGF: Factor de crecimiento transformante (Transforming growth factor)

Th: Linfocito T colaborador (T helper)

TCR: Receptor de antígenos de linfocitos T (T-cell receptor)

TLR: Receptor tipo Toll (Toll-like receptor)

TNF: Factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor)

Tregs: Linfocitos T reguladores

VAP: Proteína de adhesión vascular (Vascular adhesion protein)

RESUMEN

Los linfocitos B reguladores (Bregs) se caracterizan por la producción de interleuquina 10 (IL-10), una de las principales moléculas inmunosupresoras, capaz de atenuar o prevenir enfermedades autoinmunes gracias a la disminución de la respuesta inflamatoria y la inhibición de células T efectoras. Para la secreción de IL-10 por Bregs humanas son necesarias señales de activación del receptor tipo Toll 9 (TLR9), del receptor de antígenos del linfocito B (BCR) o del receptor CD40. Estudios en ratones han demostrado que estas señales son inhibidas por receptores para ácido siálico, Siglecs, entre los que se encuentran Siglec 2/CD22 y Siglec 10/Siglec G. De acuerdo a estos antecedentes hemos generado la siguiente hipótesis:

La expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B humanos es atenuada por la activación de los receptores Siglec 2 y Siglec 10. Para responder la hipótesis se propuso una metodología mediante la cual caracterizamos mediante citometría de flujo (FACS) la expresión de estos receptores en poblaciones de linfocitos B humanos en reposo y activados mediante ligandos de TLR9, BCR y CD40. Además, mediante ELISA y FACS, evaluamos la secreción y expresión de IL-10, respectivamente, por linfocitos B activados con ligandos de TLR9, BCR y CD40, en presencia y ausencia de fracciones Fc de IgG humana, un agonista de los receptores Siglec 2 y Siglec 10. Finalmente, caracterizamos el rol de cada uno de estos Siglecs en la inhibición de la expresión y secreción de IL-10 por células B mediada por fracciones Fc de IgG humana, mediante el uso de un anticuerpo bloqueante para Siglec 10 y de un receptor Siglec 2 soluble recombinante. Nuestros resultados apuntan a que Siglec 2 y Siglec 10 se expresan en subpoblaciones de linfocitos B humanos de memoria, vírgenes y transicionales, tanto en reposo como tras ser activados a través de sus receptores TLR9, BCR y CD40. Además, se mostró que el fragmento cristalizante de IgG humana disminuye la secreción y expresión de IL-10 en linfocitos B humanos activados vía TLR9, BCR y CD40.

Finalmente esta disminución en la secreción y expresión de IL-10 es mediada por Siglec 2 y Siglec 10, principalmente en lo que respecta a la estimulación vía CD40. En conclusión, se pudo comprobar que la señalización a través de Siglec 2 y Siglec 10 disminuye la secreción y expresión de IL-10 en linfocitos B reguladores, lo que pudiera interferir con su función supresora de la respuesta inmune.

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos B son considerados como células efectoras de la respuesta inmune, ya que son las células encargadas de la producción de anticuerpos, pero además entre sus funciones se cuenta la ayuda que prestan a la activación de células T CD4+ a través de la presentación de antígenos, la coestimulación y la secreción de citoquinas. Por otro lado, se ha descrito que juegan un rol central en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes a través de la secreción de autoanticuerpos, los que promueven inflamación tisular con la consecutiva destrucción del tejido. Actualmente se utilizan algunas terapias que apuntan a la eliminación de este tipo celular para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, destacándose el anticuerpo monoclonal anti-CD20, Rituximab. Este anticuerpo destruye la mayoría de las poblaciones de linfocitos B, exceptuando las células plasmáticas (Gürcana *et al.*, 2009).

Existen diferentes poblaciones de linfocitos B, entre las que se encuentran los linfocitos B inmaduros, linfocitos B transicionales (células en etapas finales de maduración y en tránsito a órganos linfoides secundarios), linfocitos B vírgenes, linfocitos B de memoria, plasmablastos (precursores de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos) y células plasmáticas (Carsetti *et al.*, 2004; Sims *et al.*, 2005). Dentro de la población transicional humana, caracterizada por una alta expresión de CD24 y CD38 (CD24^{hi} CD38^{hi}), hay un grupo de células que se ha identificado bajo el nombre de linfocitos B reguladores o Bregs, que corresponden a aquellas células capaces de producir IL-10 e inducir células T reguladoras (Tregs), inhibiendo la polarización de células T vírgenes a células T efectoras del tipo *T helper* 1 (Th1) y Th17, junto con inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias por células mieloides (Bouaziz *et al.*, 2010; Blair *et al.*, 2010; Iwata *et al.*, 2011).

IL-10, una citoquina pleiotrópica

La IL-10 fue descrita en el año 1989 por Mosmann y cols., siendo originalmente llamada Factor Inhibidor de la Síntesis de Citoquinas (CSIF) (Fiorentino *et al.*, 1989). Actualmente, se sabe que IL-10 es secretada por una multiplicidad de distintos tipos celulares, incluyendo ciertas poblaciones de células T, monocitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), células B, células NK, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos (Sabat *et al.*, 2010). El receptor de IL-10 está compuesto por dos cadenas, IL-10R1 e IL-10R2, las que en conjunto se expresan principalmente en leucocitos y ocasionalmente en otros tipos celulares y tejidos, lo que da cuenta de la gran diversidad de efectos que manifiesta esta citoquina (Kotenko, 2002). La principal función de IL-10 corresponde a su capacidad de inhibir las respuestas inmunes innata y adaptativa, y de esta forma limitar el potencial daño tisular generado por la inflamación (Ouyang *et al.*, 2011). Las dianas centrales del efecto supresor de IL-10 son los monocitos, macrófagos y DCs, en las que esta citoquina inhibe la presentación antigénica (Creery *et al.*, 1996; Willems *et al.*, 1994), aumenta la capacidad fagocítica (Buchwald *et al.*, 1999), y modula la secreción de mediadores inmunes, aumentando la expresión de citoquinas anti-inflamatorias y disminuyendo las pro-inflamatorias (de Waal Malefyt *et al.*, 1991; Fiorentino *et al.*, 1991). De esta forma, impide indirectamente la activación de las respuestas efectoras Th1 y Th17 (D'Andrea *et al.*, 1993; Schuetze *et al.*, 2005). Asimismo, IL-10 afecta directamente a los linfocitos T CD4+ al inhibir la proliferación y la producción de citoquinas del tipo Th1 y Th2 (Del Prete *et al.*, 1993; Groux *et al.*, 1996), mientras que favorece la inducción de Tregs del tipo Tr1 productores de IL-10 (Groux *et al.*, 1997). Aún más, los efectos anti-inflamatorios de IL-10 actúan sobre otras células de la respuesta innata, como neutrófilos (Cassatella *et al.*, 1993; Niino *et al.*, 1997), eosinófilos (Takanashi *et al.*, 1994) y

mastocitos (Lin y Befus, 1997).

Interesantemente, no todos los efectos de IL-10 son inhibitorios. Por el contrario, esta citoquina tiene un poderoso efecto trófico sobre los linfocitos B, al prevenir su apoptosis, y estimular su proliferación, diferenciación, cambio de clase de inmunoglobulinas y la expresión de moléculas de MHC II (Burdin *et al.*, 1997; Go *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1994; Rousset *et al.*, 1995). De la misma manera, IL-10 estimula la actividad citotóxica y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias por células NK (Carson *et al.*, 1995).

La participación de IL-10 en el desarrollo de enfermedades autoinmunes depende de la fisiopatología que subyace a éstas. Así por ejemplo, los efectos anti-inflamatorios de IL-10 han demostrado ser muy importantes en el control de enfermedades autoinmunes inflamatorias, como en los modelos animales de artritis reumatoide (AR) (Kasama *et al.*, 1995), y de enfermedad inflamatoria intestinal (Kuhn *et al.*, 1993). Por el contrario, las funciones inmunoestimulantes de IL-10 dan cuenta de sus efectos paradójicos en otros modelos de enfermedades autoinmunes, como diabetes o síndrome de Sjögren, donde la sobreexpresión de IL-10 determinó un desarrollo más acelerado del daño tisular (Wogensen *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1999). De forma similar, en un modelo murino de lupus, se observó que el bloqueo de IL-10 protegía del desarrollo de nefritis, mientras que la administración de esta citoquina aceleraba el desarrollo de la enfermedad, lo que tendría relación con la función inhibitoria de IL-10 sobre los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF) endógeno (Ishida, 1994). Por otra parte, se ha observado que células mononucleares de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) producen mayores niveles de IL-10 que células de individuos sanos, y éstas al ser transferidas a ratones inmunodeprimidos, inducen la producción de autoanticuerpos, lo que se revirtió con un anticuerpo bloqueante de IL-10 (Llorente *et al.*, 1995).

Ligandos que estimulan la producción de IL-10 en células B

Poco se sabe de las vías que gobiernan la producción de IL-10 en células B. En ratones, se ha evidenciado que la activación del receptor tipo Toll 9 (TLR9) mediante agonistas del tipo oligodeoxinucleótidos (ODN) de secuencias CpG no metiladas induce la secreción de IL-10 (Brummel y Lenert, 2005; Lenert *et al.*, 2005). Además, se ha comprobado que la secreción de IL-10 se puede inducir en células B murinas por medio de la estimulación de TLR4 con lipopolisacárido (LPS), en conjunto con los activadores inespecíficos forbol-acetato-miristato (PMA) e ionomicina, (Yanaba *et al.*, 2008; Matsushita y Tedder, 2011). Por otro lado, la estimulación por medio del receptor de antígenos BCR y/o mediante el ligando de CD40 (CD40L o CD154) también inducen la secreción de IL-10 en células B de ratones (Fillatreau *et al.*, 2002; Mauri *et al.*, 2003). En cuanto a la producción de IL-10 por células B humanas, se ha demostrado que es posible inducir su secreción mediante la activación de TLR9 (Gantner *et al.*, 2003; Miles *et al.*, 2012), la adición de vitamina D3 (Heine *et al.*, 2008), y la estimulación del receptor CD40 y el BCR (Burdin *et al.*, 1997), entre otros estímulos.

Vías de señalización responsables de la producción de IL-10 en el sistema inmune

Las rutas intracelulares que conducen a la secreción de IL-10 comparten vías similares entre distintos tipos celulares. Saraiva y O'Garra en el año 2010, publicaron una completa revisión de las principales vías de regulación en la expresión de IL-10 por células del sistema inmune, en la que describen que la expresión de IL-10 puede ser estimulada por una vía dependiente y otra independiente de TLRs (Saraiva y O'Garra, 2010). En el caso de la vía dependiente de TLRs, activada preferentemente en distintas células presentadoras de antígenos (APCs), se han identificado algunas moléculas de señalización intracelular que median la

expresión de IL-10, como la proteína adaptadora de respuesta primaria de la diferenciación mieloide 88 (MyD88) que permite la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y el factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B) (Akira y Takeda, 2004). En relación a la vía independiente de TLRs, que es activada en linfocitos T entre otras células del sistema inmune, de forma similar a lo que ocurre en células mieloides, se ha descrito que NF κ B y MAPKs son responsables de la expresión de IL-10, aunque también se ha demostrado la participación de factores transcripción como el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)3 y STAT4, y GATA3 (Saraiva *et al.*, 2009; Shoemaker *et al.*, 2006; Stumhofer *et al.*, 2007).

En linfocitos B, las vías de señalización que regulan la expresión de IL-10 han sido dilucidadas parcialmente. Para el caso de la vía dependiente de TLRs, principalmente se ha descrito que la activación de TLR9 mediante ODN de secuencias CpG no metiladas induce la activación de la vía de las MAPKs, quinasa N-terminal cJun (JNK), y p38, además de NF- κ B y la proteína activadora (AP)-1 (Yi *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha demostrado la relevancia de 2 vías independientes de TLRs para la expresión de IL-10: una de ellas es la estimulación mediante CD40L que activa CD40 e induce la activación de las vías JAK3 y STAT3 (Blair *et al.*, 2010), y la otra es la estimulación mediante agonistas del BCR (Burdin *et al.*, 1997). La transducción de señales, tras la activación del BCR, es mediada por las moléculas asociadas al receptor I α /I β (CD79a/CD79b) que contienen motivos de activación basados en tirosina (ITAM). Lyn es una quinasa que fosforila estos motivos y forma un complejo que corresponde a un ensamblaje de una serie de proteínas como la quinasa Syk, la fosfolipasa-C γ (PLC γ), la fosfoinositido-3 quinasa (PI3K), la tirosina-quinasa de Bruton (BTK) y moléculas adaptadoras como *B cell linker* (BLNK) (Dal Porto *et al.*, 2004). La PLC γ media la producción de 1,4,5 inositol-trisfosfato (IP $_3$) que en la membrana del retículo endoplásmico se une a sus receptores

produciendo la apertura de los canales de Ca^{+2} y generando el aumento de éste en el citosol (Feske, 2007; Scharenberg *et al.* 2007). La depleción de Ca^{+2} en el retículo endoplásmico induce la apertura de los canales de Ca^{+2} operados por almacenamiento (SOC) presentes en la membrana plasmática, los que permiten el ingreso de Ca^{+2} desde el medio extracelular. El Ca^{+2} actúa como segundo mensajero y activa la proteína quinasa C (PKC), que a su vez activa a NF- κ B. Por otro lado se activa a la calmodulina, que es una proteína que une Ca^{+2} y que a su vez activa a la fosfatasa calcineurina, la que desfosforila y activa al factor nuclear de células T activadas (NFAT) (Kurosaki *et al.*, 2010). Se ha comprobado en ratones que la activación de NFAT dependiente de la apertura de los canales SOC es fundamental para la producción de IL-10 por linfocitos B, y para su función reguladora (Matsumoto *et al.*, 2011).

Como hemos revisado, en general se han caracterizado algunas de las señales de activación que estimulan la producción de IL-10 en células B, sin embargo, el rol regulador de los receptores inhibitorios frente a la producción de IL-10 ha sido escasamente descrito.

Lectinas tipo inmunoglobulinas que unen ácido siálico (Siglecs)

Los Siglecs son receptores que unen ácido siálico y pertenecen a la familia de inmunoglobulinas tipo lectinas. Son expresados por diversas células del sistema inmune y en humanos se han descrito alrededor de 15 tipos diferentes (Pillai *et al.*, 2012). Entre los miembros existentes comparten algunas características estructurales, como por ejemplo el hecho de poseer sólo una región de transmembrana y de presentar en la región intracelular tirosinas que pueden ser fosforiladas. Estas tirosinas a menudo son parte de una secuencia consenso de motivos inhibitorios basados en tirosinas (ITIMs) (Pillai *et al.* 2012). En la porción extracelular poseen dominios tipo inmunoglobulinas (Igs) y su dominio más distal,

tipo V-set, es el principal responsable de la unión de ácido siálico (Van der Merwe *et al.*, 1996; Vinson *et al.*, 1996).

En cuanto a las proteínas que interaccionan con los dominios citoplasmáticos de Siglecs, se ha demostrado que éstos reclutan moléculas como la quinasa Lyn, la tirosina quinasa Syk, proteína unida al receptor del factor de crecimiento (Grb) 2, 5'-inositol fosfatasa que contiene una región de homología al dominio Src2 (SHIP), PI3K y PLC γ (Law *et al.*, 1996; Poe *et al.*, 2000; Tuscano *et al.*, 1996b; Wienands *et al.*, 1995). Dependiendo del contexto en que las moléculas son reclutadas, podrían estar ejecutando diferentes respuestas (Fujimoto *et al.*, 2006).

El proceso de sialilación es una modificación habitual de glicoproteínas, que ocurre en el complejo de Golgi en todas las células de vertebrados (Angata y Varki, 2002). Estos azúcares se encuentran generalmente en las posiciones terminales de las cadenas de oligosacáridos unidas a numerosas proteínas, formando un amplio espectro de posibles ligandos para Siglecs. La especificidad de sustrato por diferentes Siglecs es diversa, y la afinidad de unión puede estar determinada por el tipo de ácido siálico, el tipo de unión que tenga éste con la cadena de oligosacáridos y también las características de esta cadena (Angata, 2006). Los Siglecs pueden unir a sus ligandos vía trans (contacto proteína-célula o célula-célula) o vía cis (interacción en la misma célula) (Pillai *et al.*, 2012).

Varios Siglecs son expresados en linfocitos B, entre los que destacan Siglec 2 (CD22) y Siglec 10, en ratones denominado Siglec G (Crocker *et al.*, 2007; Cao y Crocker, 2011). Antígenos que poseen ácido siálico, al ser reconocidos en linfocitos B por los Siglecs, en paralelo a su unión al BCR, son capaces de inducir tolerancia (Nitschke *et al.*, 1997; Paulson *et al.*, 2012). El ácido siálico está generalmente ausente en estructuras de microorganismos pero abunda en proteínas de vertebrados, por lo que podría ser una importante señal de tolerancia.

Se ha descrito que algunos patógenos en su superficie presentan glicanos que al ser reconocidos por Siglecs generan una disminución en la regulación de la respuesta inmune del hospedero (Cao y Crocker, 2011). La noción de que Siglecs cumplen un rol en la tolerancia periférica de antígenos propios fue primero propuesta para Siglec 2 (Pillai *et al.*, 2009), y posteriormente ratificada también para Siglec G/10 (Jellusova *et al.*, 2010a). En células B, estos receptores Siglecs contribuyen al mantenimiento de la tolerancia mediante la inhibición de vías de activación que culminan en la supresión de la producción de anticuerpos, una posible regulación directa o indirecta de las respuestas de células T, y finalmente la prevención de enfermedades autoinmunes (Macauley *et al.*, 2014).

Las vías activadas por Siglec 2 y Siglec 10 interaccionan con algunas vías de señalización en los linfocitos B. Se ha demostrado que cuando se activa la vía del BCR, Lyn fosforila dominios intracelulares de ITIM en Siglec 2 y Siglec 10 permitiendo el reclutamiento de fosfotirosinas que desencadenan en la inhibición de una serie de señales río abajo del BCR, como por ejemplo la disminución de los niveles de calcio intracelular (Fujimoto *et al.* 1999; Gerlach *et al.* 2003). Complementando estos resultados, en el caso de células B de ratones deficientes de Siglec 2 y Siglec 10, se observa un aumento del calcio intracelular lo que evidencia un claro rol inhibitorio de estos receptores (O'Keefe *et al.* 1996; Nitschke *et al.* 1997; Hoffmann *et al.* 2007). Ambos, Siglec 2 y Siglec 10, también modulan negativamente las señales activadas por TLRs en células B. El mecanismo exacto de modulación es aún desconocido, sin embargo se ha sugerido que Siglec 2 podría inhibir la activación de NFkB dependiente de TLR4 y podría reducir la expresión SOCS1 y SOCS3 (Kawasaki *et al.*, 2011). Además, en ratones también se evidenció que células B deficientes de Siglec 2 y Siglec 10 muestran una respuesta proliferativa exacerbada cuando son estimuladas a través de TLR4, TLR7 o TLR9 (Kawasaki *et al.* 2011; Jellusova y Nitschke 2012). Finalmente, se ha

demostrado que células B de ratones deficientes de Siglec 2, en presencia de anticuerpos agonistas contra CD40, la respuesta proliferativa es mucho mayor comparada con células B normales (Poe *et al.*, 2004); sin embargo es menor la evidencia científica relacionada a los mecanismos de interferencia de esta vía de señalización.

Siglec 2/CD22

Siglec 2 es una proteína de membrana de tipo 1 con un peso molecular de 140 kDa, que se expresa en bajos niveles en células pre-B e inmaduras y altos niveles en células B maduras de centro germinal, foliculares, de zona marginal y en menor grado en la población B1a (Pillai *et al.*, 2012), disminuyendo su expresión en células plasmáticas (Terstappen *et al.*, 1990). Un par de trabajos en células humanas demuestran que la expresión de Siglec 2 en sangre periférica predomina principalmente en poblaciones de células B vírgenes (CD27-) comparadas con poblaciones de memoria (CD27+) (Jacobi *et al.*, 2008; Daridon *et al.*, 2010). El ligando para Siglec 2 es el ácido siálico α 2,6 galactosil β 1-4 ácido neuramínico glucosamínico (Gal β 1-4GlcNAc), y se ha demostrado que su afinidad por éste es baja (10^{-4} M) (Nitschke, 2005).

En su zona extracelular Siglec 2 contiene 7 dominios tipo Igs y el dominio más extremo es un dominio tipo V-set. En este dominio extremo tiene 2 argininas (R130 y R137 en ratones) que son indispensables para la unión al ácido siálico (Van der Merwe *et al.*, 1996). En su cara citoplasmática, contiene 6 tirosinas, tres de ellas son encontradas en la mayoría de los ITIMs (Y783, Y843 e Y863), otra tirosina en un dominio tipo ITIM (Y817), otra necesaria para el reclutamiento de la proteína adaptadora involucrada en la transmisión de señales Grb2 (Y828) y la última (Y773) con función desconocida (Otipoby *et al.*, 2001). Entre las

moléculas que se acoplan a los dominios ITIM fosforilados de Siglec 2 se encuentran la fosfatasa SHIP-1 (Poe *et al.*, 2000), y la fosfatasa que tiene un dominio con una región homóloga al dominio Src 2 (SHP)-1 (Doody *et al.*, 1995; Kelm *et al.*, 2002). Se ha demostrado que SHP-1 inhibe Vav-1, un proto-oncogen que inicia el aumento de Ca^{+2} intracitoplasmático secundario a la activación de CD19 y BLNK (Sieger *et al.*, 2013; Gerlach *et al.*, 2003). SHIP-1 por su parte es requerido para la activación mediada por Siglec 2 de la bomba de Ca^{+2} PMCA4 ubicada en la membrana plasmática, que promueve la salida de Ca^{+2} desde el citoplasma (Chen *et al.*, 2004). Por otra parte la región citoplasmática de Siglec 2 contiene 2 dominios de tipo ITAM, lo que genera algunas controversias, ya que bajo ciertas circunstancias favorecen la proliferación de linfocitos B entregando señales de activación (Tuscano *et al.*, 1996a; Tuscano *et al.*, 1999).

Adicionalmente terapias con anticuerpos monoclonales dirigida contra este receptor se están usando para algunas enfermedades autoinmunes. Este es el caso de Epratuzumab, anticuerpo específico contra Siglec 2, que modula las señales vía BCR y aumenta el rol inhibitorio de CD22, disminuyendo la activación de células B en pacientes con SLE (Dörner *et al.*, 2015).

Siglec 10/SiglecG

Siglec10 o Siglec G es un receptor menos estudiado que los otros miembros de su familia. Este receptor inhibitorio pertenece a la familia de los Siglecs relacionados a CD33, y su expresión ha sido estudiada principalmente en ratones, encontrándose expresado en diversos tipos celulares, como DCs, linfocitos T y linfocitos B (Pillai *et al.*, 2012; Bandalá-Sánchez *et al.*, 2013). En los linfocitos B murinos se encuentra en todas las sub-poblaciones,

pero su expresión es particularmente elevada en las células de zona marginal y B1a (Pillai *et al.*, 2012). Siglec G tiene 5 dominios tipo inmunoglobulinas en su cara extracelular, mientras que en su cara intracelular posee secuencias ITIM. Cuando Siglec 10 es activado se aumenta la accesibilidad de quinasas de la familia Src al dominio citosólico ITIM y se fosforilan las zonas ricas en tirosinas, creándose sitios de unión para varias proteínas con dominios SH2 como las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 (Whitney *et al.*, 2001).

Siglec 10 es el único miembro de su familia capaz de reconocer ligandos decorados con ácido siálico en uniones $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, con igual afinidad (Nitschke, 2009). Uno de los pocos ligandos descritos para Siglec 10 humano es la proteína activa de adhesión vascular 1 (VAP-1), que se expresa en células endoteliales y leucocitos circulantes (Kivi *et al.*, 2009). Recientemente, se ha descrito un nuevo ligando para Siglec 10 y Siglec G, que correspondería a la molécula CD52, la cual, en estado soluble se une a Siglec 10 y es capaz de reducir la activación de linfocitos T (Bandala-Sánchez *et al.*, 2013). Se ha estudiado la interacción entre Siglec 10 y moléculas que reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como CD24, que es una molécula de superficie anclada a la membrana por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y que posee azúcares en su estructura. Producto de esta interacción, CD24 en conjunto con Siglec 10 podrían atrapar DAMPs, previniendo que se unan a otros receptores agonistas como los TLRs. Por otro lado, se postula que CD24, al no poseer un dominio intracelular, debe interactuar con Siglec 10 atenuando otras vías de activación (Chen *et al.*, 2009).

Se ha evidenciado en células B1 que la activación del BCR en ausencia de activación de Siglec G tiene por consecuencia un incremento en los niveles de Ca^{+2} intracitoplasmático y en la producción de anticuerpos IgM naturales, constatando un rol de este receptor en la atenuación de las vías dependientes de BCR (Hoffmann *et al.*, 2007).

Inmunoglobulinas como ligandos de Siglecs

La administración de un concentrado de Igs humanas por vía endovenosa (IVIg) es una eficaz terapia para una serie de enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos B, tales como púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), enfermedad de Kawasaki y LES (Nimmerjahn y Ravetch, 2008). No obstante, a la fecha aún se desconocen los mecanismos exactos mediante los cuales actúa la IVIg. Recientes estudios han demostrado que la actividad anti-inflamatoria de IVIg es completamente dependiente de N-glicosilaciones en la fracción cristalizable (Fc) de las Igs. El grupo de Ravetch y cols. demostró, en un modelo de artritis murina, que la fracción de IVIg rica en ácido siálico (IVIg-SA+) es aquella que posee el efecto anti-inflamatorio. Más aún, este efecto se replicó al usar sólo fragmentos Fc de IVIg-SA+, atribuyéndole la función protectora a los ácidos siálicos presentes en esta región (Kaneko *et al.*, 2006). Dos años más tarde el mismo grupo confirmó sus hallazgos en base al uso de fragmentos Fc recombinantes sialilados, evidenciando un efecto similar de protección (Anthony *et al.*, 2008).

Es importante recordar que la cadena pesada de la región Fc de Ig posee N-glicosilaciones en el aminoácido N297. Esta porción puede unir diferentes residuos de azúcares, lo que le confiere una alta variabilidad (Arnold *et al.*, 2007). Entre ellas, se han demostrado uniones $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ de ácido siálico (Takahashi *et al.*, 1987; Jassal *et al.*, 2001), por lo que es probable que al menos parte del efecto modulador de los fragmentos Fc de Igs esté mediado por receptores tipo Siglecs.

Por otra parte, una interacción de Siglec 2 con ácido siálico presente en Igs fue demostrada en linfocitos B humanos por Seite y cols., el año 2010. En sus experimentos *in*

in vitro se evidencia que al agregar IVIg-SA+ a cultivos celulares de linfocitos B humanos, éste se une a Siglec 2. Además se demuestra que, en presencia de IVIg, la activación de linfocitos B mediante el BCR induce apoptosis (Seite *et al.*, 2010), a diferencia de la activación mediante CD40L (De Grandmont *et al.*, 2003). Dos años más tarde, este mismo grupo demostró que la presencia *in vitro* de IVIg disminuye la señalización vía TLR9 y TLR7/8 de células B humanas, lo que se replica al utilizar sólo las porciones Fc de IVIg, sugiriendo que este efecto pudiera estar mediado por Siglecs. Se suma a este hallazgo la primera evidencia de que IVIg disminuye la producción de citoquinas, entre ellas IL-10, en células B humanas activadas vía TLR9 (Seite *et al.*, 2011). En este set de experimentos no se comprobó si el efecto mediado por la fracción de Fc de IVIg sobre la producción de IL-10 fue mediado por Siglec 2, Siglec 10, o bien por FcγRIIb, un receptor para la fracción Fc de IgG de función inhibitoria. Un trabajo en paralelo publicado el año 2011 comprueba que IVIg disminuye la producción de IL-10 en células B de pacientes con LES y donantes sanos activadas vía TLR9, sugiriendo un nuevo mecanismo de modulación por IVIg (Kessel *et al.*, 2011).

Como hemos revisado, aún falta profundizar en la biología de los Bregs y entender cómo su función es regulada por señales de activación e inhibición. Cabe destacar que la caracterización de Siglec 2 y Siglec 10 en subpoblaciones de linfocitos B y el efecto de estos receptores sobre la expresión de IL-10 aún no ha sido descrita. Sobre la base de los antecedentes presentados, nosotros proponemos un modelo según el cual linfocitos B estimulados a través de receptores como BCR, CD40 y TLR9, producen IL-10, lo que es atenuado en presencia de agregados de Fc de IgGs ricas en ácido síalico, las que actuarían, en parte, a través de Siglec 2 y Siglec 10 (Figura 1).

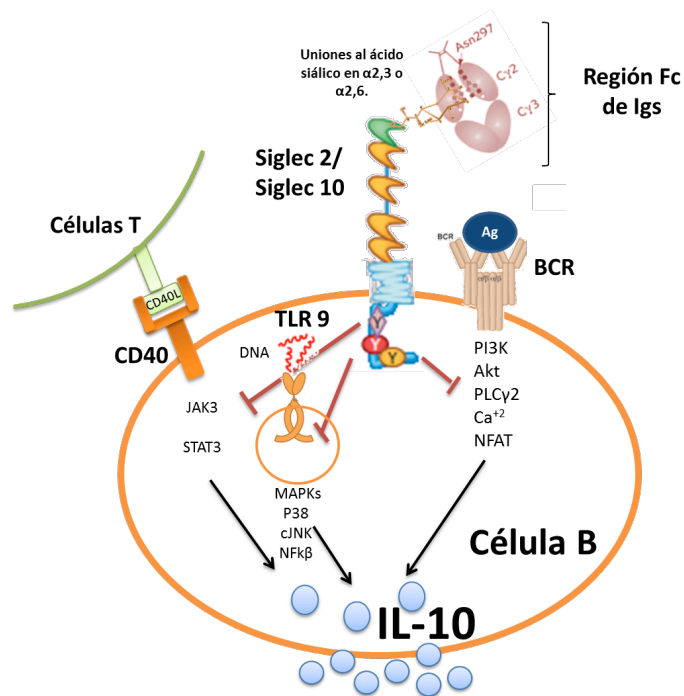


Figura 1: Inhibición de la producción de IL-10 por linfocitos B, mediada por receptores Siglecs. Células B humanas son activadas por agonistas de los receptores BCR, TLR9 y CD40. La activación simultánea de receptores inhibitorios como Siglec 2 y Siglec 10 mediante el fragmento Fc de inmunoglobulinas ricas en ácido siálico, regula la expresión de IL-10 y las funciones reguladoras de linfocitos B.

HIPÓTESIS

La expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B humanos es atenuada por la activación de los receptores Siglec 2 y Siglec 10.

OBJETIVO GENERAL

Comprender la función de Siglec 2 y Siglec 10 en la regulación de la expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en las poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria y transicionales.**
- 2.- Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40.**
- 3.- Medir la expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B estimulados vía BCR, TLR9 y CD40, en presencia de un agonista para Siglec 2 y Siglec 10.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en las poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria y transicionales.

Donantes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se obtuvieron *buffy coats* de donantes sanos desde el Banco de Sangre del Hospital Clínico, Universidad de Chile, previa firma de un formulario de consentimiento informado (Anexos 1 y 2). Se consideraron como criterios de inclusión: Individuos mayores de 18 años; peso corporal mayor a 50 Kg; niveles de hemoglobina en sangre mayores o iguales a 13,5 gr/dl en hombres y 12,5 gr/dl en mujeres; tiempo transcurrido desde la última donación de sangre superior a tres meses. Se consideraron los siguientes criterios de exclusión: Embarazo o lactancia; antecedentes de hemorragia reciente o intervención quirúrgica en los últimos 6 meses; antecedentes de enfermedad cardiovascular grave; antecedentes de enfermedad del sistema nervioso central grave; diátesis hemorrágica; episodios repetidos de síncope o antecedentes de convulsiones; antecedentes de enfermedad gastrointestinal, genitourinaria, hematológica, inmunológica, metabólica, renal o respiratoria grave; diabetes que precisa tratamiento con insulina; cáncer; antecedentes de estar infectado por los agentes infecciosos causantes de Hepatitis B; Hepatitis C; SIDA; HTLV; Enfermedad de Chagas o sífilis; antecedentes de consumo de drogas por vía intravenosa o intramuscular no prescritas; personas sometidas a trasplantes; personas transfundidas en los últimos seis meses; personas cuya conducta sexual supone riesgo elevado de contraer enfermedades infecciosas graves; personas sometidas a endoscopía en los últimos seis meses; personas sometidas a tatuajes, bacterias o virus atenuados en los últimos 12 meses; personas que se han medicado con aspirina o anti-

inflamatorios en los últimos tres días. Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética del Hospital Clínico y la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 3 y 4).

Evaluación de la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B en reposo

Se aisló la fracción de PBMC desde los *buffy coats* mediante gradiente de densidad por centrifugación en ficoll (Axis-Shield). Para discriminar diferentes poblaciones de linfocitos B por citometría de flujo (FACS), el PBMC fue teñido con los siguientes anticuerpos conjugados a fluoróforos: anti-CD19, anti-CD38 y anti CD24 (Biolegend). Las células CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} corresponden a células B transicionales, las células CD19⁺ CD24^{mid} CD38^{mid} corresponden a células B vírgenes, y las células CD19⁺ CD24^{hi} CD38⁻ corresponden a células B de memoria (Bouaziz *et al.*, 2010). En cada una de estas poblaciones se evaluó la presencia Siglec 2 y Siglec 10 usando anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos (Biolegend). Para definir la población que expresa los receptores, se utilizó como umbral negativo el FMO (fluorescence minus one), que son células marcadas para CD19, CD24 y CD38, en ausencia de anticuerpos anti-Siglec 2 o Siglec 10, respectivamente. Las muestras fueron analizadas mediante FACS (FACSCalibur, Becton Dickinson), y los datos procesados en el programa Weasel v3.0.

2.- Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40.

Evaluación de la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados

Los linfocitos B fueron aislados desde *buffy coats* de donantes sanos mediante selección negativa por inmunodensidad (RosetteSep™ Human B Cell Enrichment Cocktail, Stemcell).

Las células B fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10%, más una mezcla de estreptomicina y penicilina al 1% (Gibco), a una densidad de 1×10^6 cel/ml, en placas de 96 pocillos, a 37°C, con 5% de CO₂. Las células, cultivadas por 48 horas, fueron activadas por distintos periodos de tiempo (48 horas, últimas 24 horas o últimas 12 horas de cultivo) con los siguientes estímulos: 1.- Anticuerpos agonistas anti-BCR (IgG+IgM; Jackson ImmunoResearch); 2.- Una línea celular murina de fibroblastos 3T3NIH que ha sido transfectada con CD40L humano; y 3.- *Cytosinephosphodiester-guanine oligodeoxynucleotides* (ODN-CpG) 2006 (Invivogen), agonista de TLR9. Luego, las células fueron recuperadas y la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 fue detectada mediante FACS. Como control experimental se usaron células sin estimular cultivadas por 48 horas. También se evaluaron concentraciones crecientes de los estímulos antes mencionados, usados durante 48 horas de cultivo.

Activación de la producción de IL-10 en linfocitos B humanos

Se purificaron linfocitos B desde *buffy coats*, los que fueron cultivados por 48 horas a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 suplementado, en placas de 96 pocillos. Estos linfocitos B fueron estimulados a producir IL-10 mediante la incubación con ligandos de BCR, TLR9 y CD40 a distintas concentraciones, durante 12, 24 ó 48 horas. Durante las últimas 5 horas de cultivo, se adicionaron 50 ng/ml de PMA, y 1 ug/ml ionomicina (Io) (Sigma-Aldrich) para favorecer la secreción de IL-10 al medio de cultivo. La producción de IL-10 fue cuantificada desde los sobrenadantes de los cultivos colectados al cabo de 48 horas, mediante un kit de ELISA (eBioscience). Los niveles de IL-10 secretados fueron normalizados de acuerdo al número de linfocitos B vivos presentes al término del cultivo, contabilizados mediante hemocitómetro usando la tinción de azul de tripán. También se analizó la expresión

intracelular de IL-10 por FACS utilizando un anticuerpo específico, previa adición de brefeldina A (Biolegend) durante las últimas 5 horas de cultivo, para impedir la movilización de vesículas secretoras.

3.- Medir la expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B estimulados vía BCR, TLR9 y CD40, en presencia de un agonista para Siglec 2 y Siglec 10.

Evaluación de la función de Siglec 2 y Siglec 10 sobre la expresión de IL-10 en linfocitos B

Siglec 2 y Siglec 10 son receptores que reconocen proteínas que contienen ácido siálico unido a galactosa en enlaces $\alpha 2,6$ (Siglec 2), o $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ indistintamente (Siglec 10) (Nitschke, 2009). Un porcentaje de las IgG humanas poseen su fragmento Fc modificado con $\alpha 2,6$ y/o $\alpha 2,3$ ácido siálico (Anthony *et al.*, 2008), y recientemente se ha descrito que esta fracción une y activa Siglec 2 en células B humanas (Seite *et al.*, 2010; 2011), aunque no se ha confirmado ni descartado que también pueda ser ligando para Siglec 10, para el que existen escasos ligandos conocidos. Con el fin de evaluar el rol de la activación de Siglec 2 y Siglec 10 en la secreción de IL-10 por linfocitos B, llevamos a cabo una metodología en la cual agregamos concentrados comerciales de fracciones Fc de IgG humana (Jackson ImmunoResearch) agregados por calor a 65°C por 30 minutos. La concentración de estas fracciones usadas fue de 5 ug/ml de cultivo, y se agregó al cultivo de linfocitos B al mismo tiempo que los ligandos de BCR, TLR9 o CD40.

Para discriminar el rol de Siglec 2 y Siglec 10 en la acción inhibitoria de los fragmentos Fc agregados, se adicionó a los cultivos de linfocitos B activados y en presencia de fragmentos Fc, un anticuerpo policlonal bloqueante del receptor Siglec 10 humano (clon

AF2130; R&D Systems), o una proteína quimera que contiene la fracción extracelular del receptor Siglec 2 humano conjugada a la fracción Fc de IgG1 humana (1968-SL-050; R&D Systems), la que es capaz de neutralizar ligandos de Siglec 2 (Bandala-Sánchez et al, 2013). Al cabo del cultivo, se evaluaron los niveles de IL-10 secretados al sobrenadante mediante ELISA y la expresión intracelular de IL-10 mediante FACS.

Análisis estadísticos

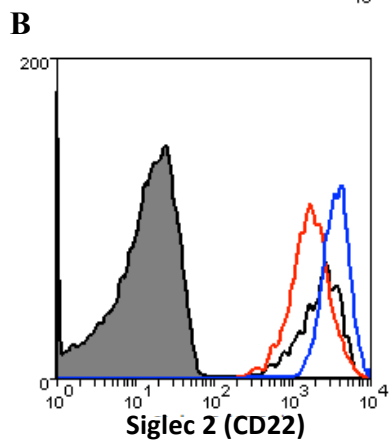
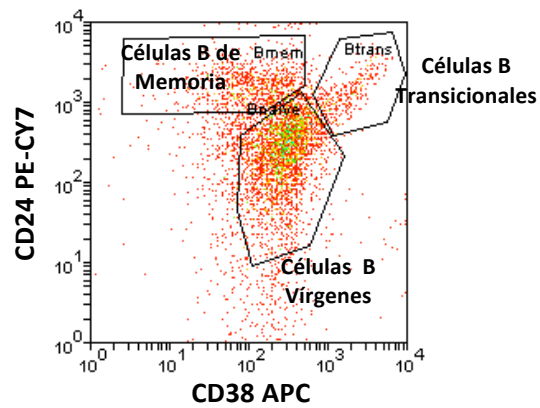
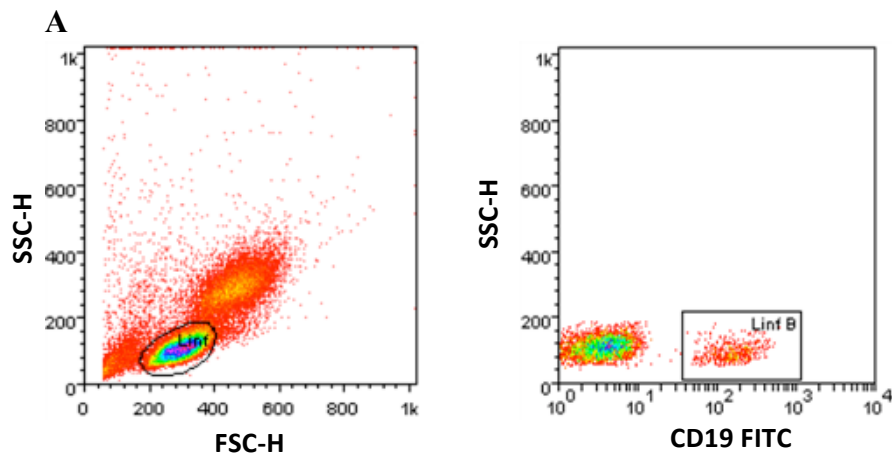
Diferencias en variables funcionales o fenotípicas entre diferentes condiciones experimentales fueron analizadas con la prueba t de Student. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Para los análisis estadísticos se usó el software GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en las poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria y transicionales.

Siglec 2 y Siglec 10 se expresan en poblaciones de linfocitos B vírgenes, de memoria y transicionales en reposo.

Se determinaron por FACS los niveles de expresión de Siglec 2 (CD22) y Siglec 10 en subpoblaciones de linfocitos B a partir de sangre de individuos sanos seleccionados en base a los criterios de inclusión y exclusión descritos en el punto 1 de materiales y métodos. Para ello, desde células frescas, se seleccionaron tres subpoblaciones de linfocitos B de acuerdo a la expresión diferencial de los marcadores celulares CD24 y CD38: vírgenes, de memoria y transicionales (figura 2A). Como se puede apreciar en el histograma de la figura 2B, se observan niveles de expresión homogéneos de ambos receptores en cada una de las 3 subpoblaciones, lo que quiere decir que en la mayoría de las células se están expresando en cantidades similares. Ahora, al analizar cuál de estas 3 subpoblaciones expresa más Siglec 2 o Siglec 10, podemos observar que Siglec 2 se expresa mayoritariamente en poblaciones vírgenes y transicionales (Media de intensidad de fluorescencia -MFI promedio: 1192,6 y 876,9 respectivamente) comparada con las poblaciones de memoria (MFI promedio: 767,8) (figura 2B). En cuanto a la expresión de Siglec 10, se aprecia que células de memoria tienen mayor expresión (MFI promedio: 73,1) que células transicionales y vírgenes (MFI promedio: 55,0 y 39,4 respectivamente) (figura 2C).



— Isotipo — Transicionales
 — Vírgenes — Memoria

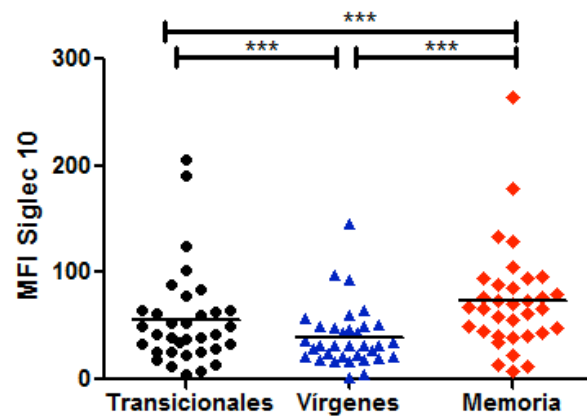
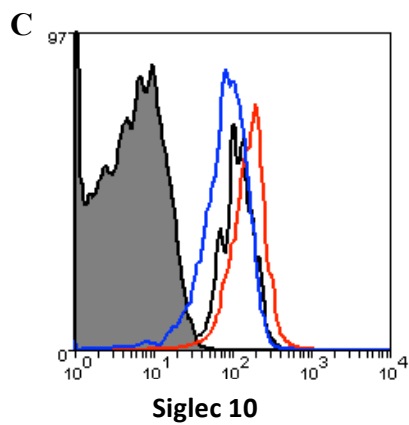
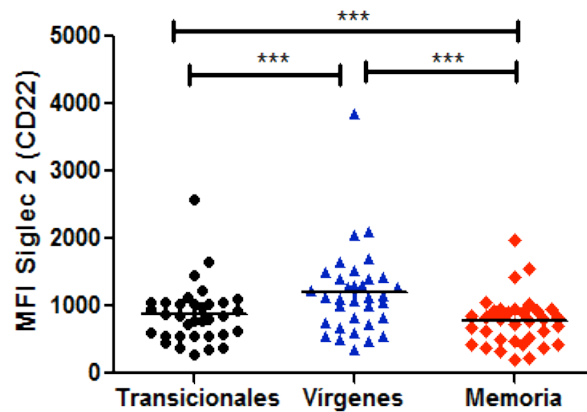


Figura 2: Siglec 2 (CD22) y Siglec 10 son expresados por todas las subpoblaciones de linfocitos B humanos. (A) Selección citométrica para identificar subpoblaciones de linfocitos B transicionales (CD19+CD24^{high}CD38^{high}), vírgenes (CD19⁺CD24^{int}CD38^{int}), y de memoria (CD19+CD24^{high}CD38⁻). En el dot plot superior izquierdo se muestra la selección de la población de linfocitos, y en el superior derecho, la selección de linfocitos B CD19+. (B, C) Histogramas representativos (izquierda) y gráficos (derecha) de la expresión de Siglec 2 (B) y Siglec 10 en las distintas sub-poblaciones de linfocitos B (C). MFI: Media de la intensidad de fluorescencia. *** p<0,001 (n = 34). Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas.

Objetivo específico 2: Analizar la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40.

Siglec 2 y Siglec 10 aumentan su expresión en linfocitos B activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40.

Con el fin de evaluar si al activar linfocitos B de manera de inducir la producción de IL-10, se mantiene la expresión de los receptores Siglec 2 y Siglec 10, se purificaron linfocitos B a partir de sangre periférica, los que fueron cultivados y activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40. La pureza de linfocitos B CD19+ fue determinada mediante FACS, obteniéndose porcentajes por sobre el 99% en todos los cultivos (figura 3A). Estos linfocitos B aislados fueron cultivados por 48 horas, y estimulados con agonistas de los receptores del TLR9, CD40 o BCR durante las 48 horas de cultivo, o durante las últimas 24 o 12 horas, o bien dejados sin estimular. Los mayores niveles de IL-10 secretada se observaron a las 48 horas de cultivo en todos los estímulos ensayados, salvo en la combinación de CpG y anticuerpos anti-BCR (figura 3B). Por otra parte, se observó que la expresión de Siglec 2

también es máxima a las 48 horas estímulo, salvo en el caso de la activación de CD40, en la que no se ven diferencias en relación al control sin estimular (figura 3C). En cuanto a la expresión de Siglec 10, cuando se estimuló los linfocitos B a través de CD40L, o del BCR y el TLR9 en conjunto, se logró apreciar un aumento significativamente mayor tras las 48 horas de estímulo, mientras que al estimular con anticuerpos anti-BCR o CpG por si solos, no se vieron diferencias respecto al control sin estimular (figura 3D).

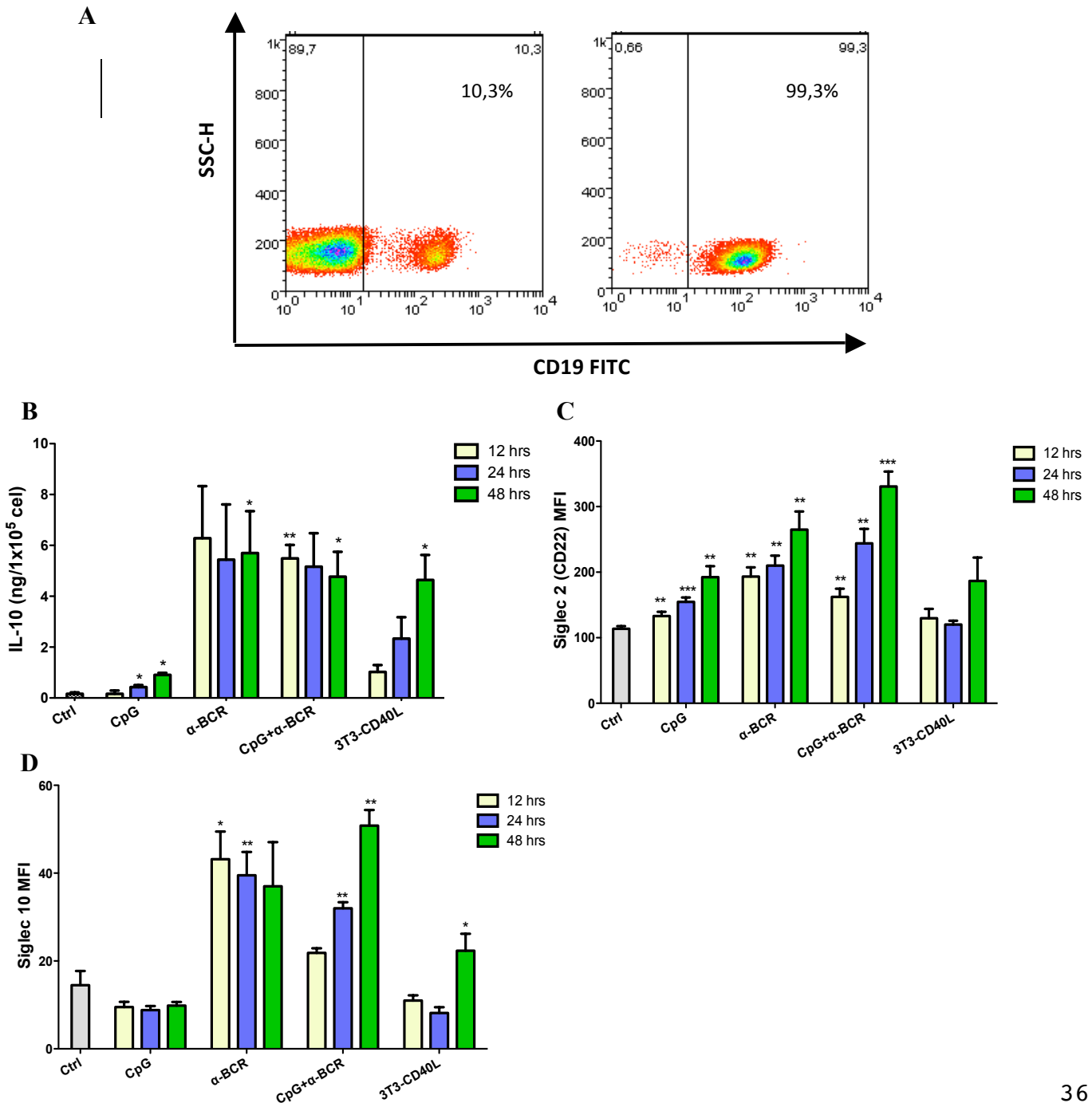


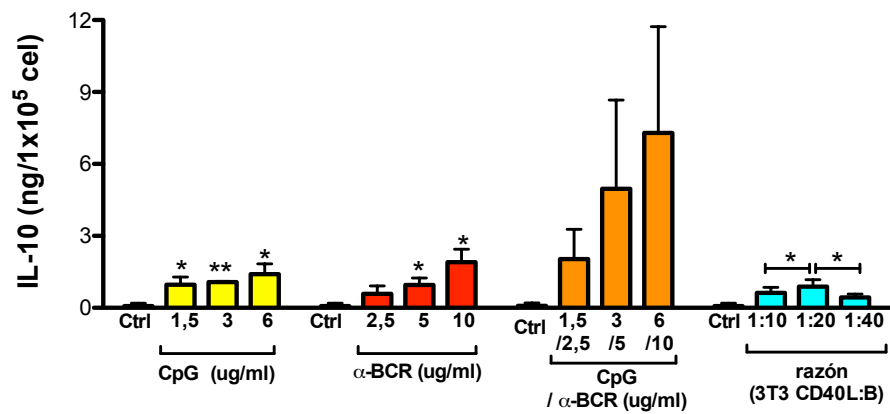
Figura 3: Aumento en la secreción de IL-10, y en la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados. (A) Purificación de linfocitos B CD19+ mediante inmunodensidad. A la izquierda dot plot representativo de células CD19+ en una muestra de sangre previo a la purificación, y a la derecha un dot plot representativo de células CD19+ después de la purificación. (B) Secreción de IL-10 por linfocitos B cultivados por 48 horas y estimulados por 12, 24 y 48 horas en presencia de 3 ug/mL de CpG, 5 ug/mL de α -BCR, una combinación de ellos, o co-cultivo con la línea celular NIH3T3 que expresa CD40L a razón de 1:10 entre células 3T3-CD40L:B o bien dejados sin estímulo (Ctrl) (n=3). El valor secretado de IL-10 fue normalizado al número de células vivas al final del cultivo. (C-D) Expresión de Siglec 2 (n=6) (C) y Siglec 10 (n=6) (D) por linfocitos B cultivados por 48 horas y estimulados por 12, 24 y 48 horas en presencia de los estímulos descritos para B. MFI: Media de la intensidad de fluorescencia. * p <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 versus Ctrl. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas.

Puesto que para la mayoría de los estímulos se logró una máxima secreción de IL-10 a 48 horas, sin inducir muerte celular (datos no mostrados), ni una disminución en los niveles de expresión de receptores Siglec 2 y Siglec 10 en los linfocitos B, se decidió mantener esta condición para futuros experimentos.

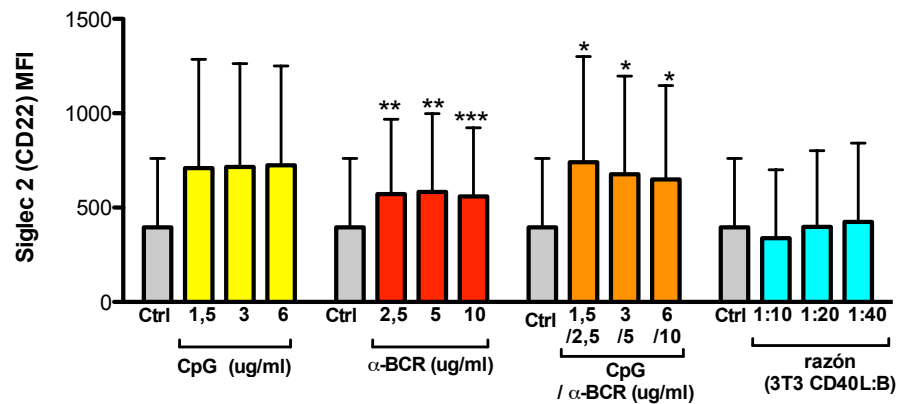
A continuación se realizaron ensayos de concentración versus respuesta, para definir la concentración óptima de los estímulos en 48 horas de cultivo para lograr una mayor secreción de IL-10, sin reducir la expresión de receptores Siglecs. En estos experimentos se determinó que las condiciones óptimas para la producción de IL-10 fueron: 3 ug/ml de CpG, 5 ug/ml de anticuerpos anti-BCR, y una razón de 1 célula 3T3-NIH que expresa CD40L por cada 20

linfocitos B (figura 4A). Nuevamente, se observó un aumento en la expresión de Siglec 2 frente a todos los estímulos, salvo CD40L, sin diferencias entre las concentraciones (figura 4B). En el caso de Siglec 10, tampoco se observan diferencias entre las distintas concentraciones de estímulos, existiendo un aumento estadísticamente significativo en la expresión de este receptor sólo al estimular con CD40L (figura 4C).

A



B



C

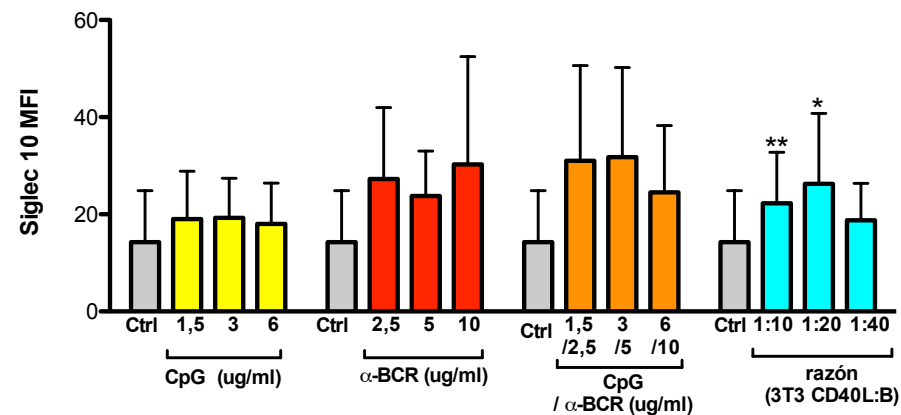


Figura 4: A mayor concentración de estímulos aumenta la secreción de IL-10 pero no la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B activados. Linfocitos B cultivados por 48 horas en presencia de 1,5, 3 y 6 ug/mL de CpG, (barras amarillas) 2,5, 5 y 10 ug/mL de anticuerpos anti-BCR (barras rojas), una combinación de esas concentraciones de CpG y α -BCR (barras naranjas), o de la línea celular NIH3T3 que expresa CD40L a razones de 1:10, 1:20 y 1:40 entre células 3T3-CD40L y células B (barras celestes) o bien dejados sin estímulo (Ctrl) (barras grises) fueron analizados para la secreción de IL-10 por ELISA, corregida por el número de células vivas al final del cultivo (**A**, n=3), para la expresión de Siglec 2 (**B**, n=4) o de Siglec 10 (**C**, n=4) mediante FACS. MFI: Media de la intensidad de fluorescencia. * p <0.05, ** p<0.01,*** p<0.001 versus Ctrl. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas.

La mayor frecuencia de células B productoras de IL-10 se encuentra contenida en la subpoblación de linfocitos B transicionales.

Una vez que se definieron los tiempos de estímulo y las concentraciones óptimas para la inducción de la producción de IL-10 por linfocitos B, se quiso determinar cuál era la subpoblación de linfocitos B que posee la mayor frecuencia de células productoras de IL-10, mediante FACS. De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos aseverar que la subpoblación de linfocitos B transicionales muestran el mayor porcentaje de células que expresan IL-10 en todas las condiciones de estímulo, comparada con las sub-poblaciones de memoria y virgen (figura 5).

A

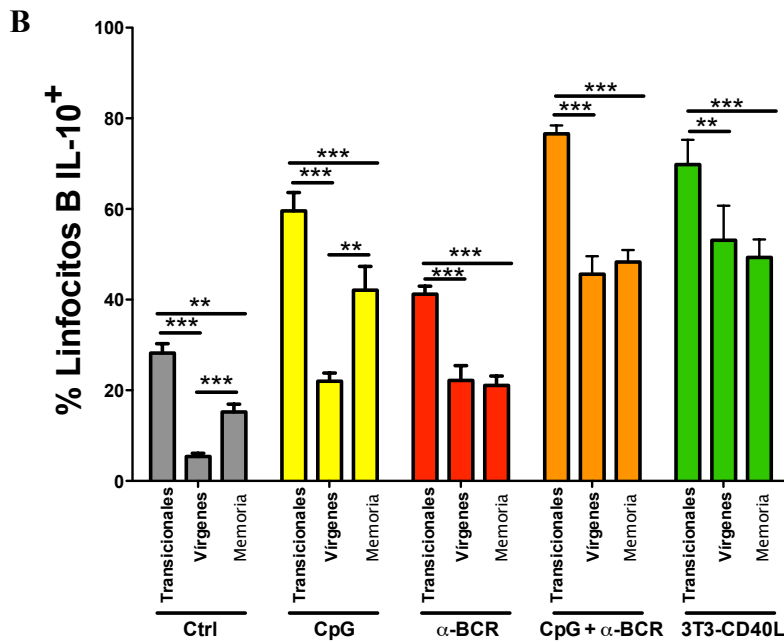
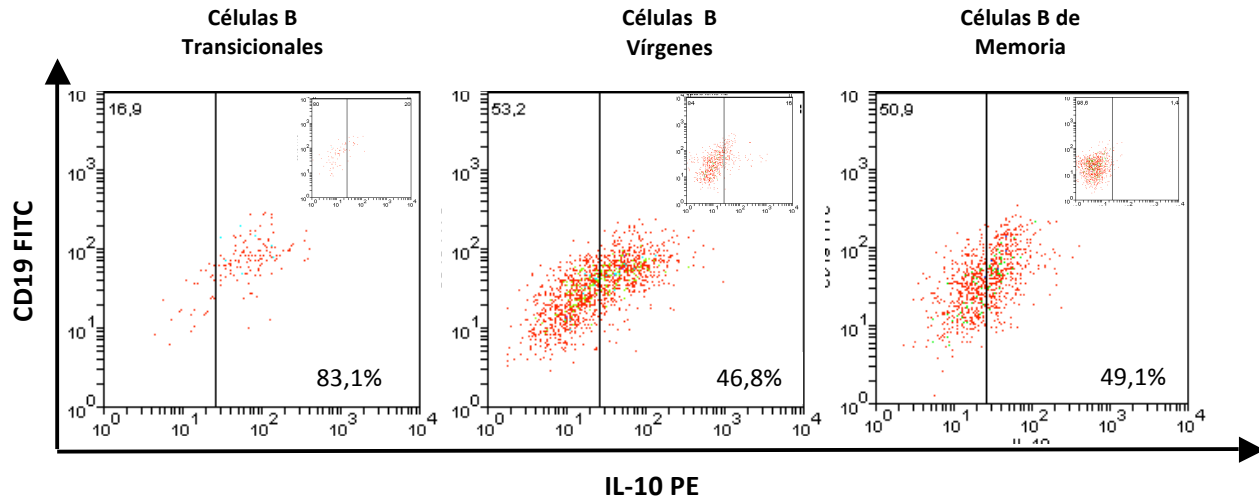


Figura 5: Linfocitos B transicionales son los mayores productores de IL-10. (A) Dot Plot representativo de subpoblaciones de células CD19⁺ IL-10⁺ transicionales (izquierda) vírgenes (centro) y memoria (derecha), en presencia de 3 ug/mL de CpG más 5 ug/mL de α -BCR. En el recuadro interno se muestran los controles negativos de tinción (FMO) (B) Linfocitos B estimulados mediante 3 ug/mL de CpG, 5 ug/mL de anticuerpos anti-BCR (α -BCR), una

combinación de ellos, o co-cultivo con la línea celular NIH3T3 que expresa CD40L a razón de 1:10 entre células 3T3-CD40L:B o bien dejados sin estímulo (Ctrl), fueron analizados para determinar el porcentaje de células productoras de IL-10 por FACS (n=10). * p <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas.

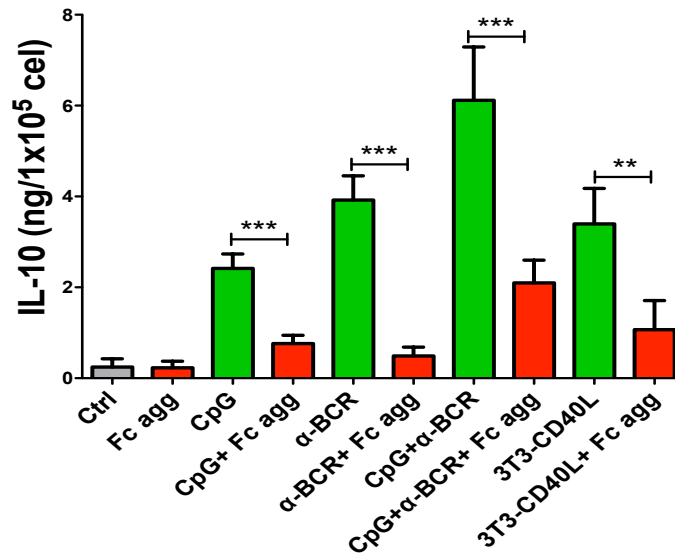
Objetivo específico 3. Medir la expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B estimulados vía BCR, TLR9 y CD40, en presencia de un agonista para Siglec 2 y Siglec 10.

Fragmento cristizable (Fc) de IgG humana disminuye la expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B.

A continuación, se quiso evaluar la influencia de los receptores Siglec 2 y Siglec 10 sobre la producción de IL-10 por linfocitos B. Dada la evidencia de la presencia de ácidos siálicos en el fragmento Fc de IgG humana (Takahashi *et al.*, 1987; Jassal *et al.*, 2001), y del uso de IVIg como ligando para el receptor Siglec 2 (Seite *et al.*, 2010), se decidió usar fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor en los cultivos de linfocitos B estimulados a través del BCR, TLR9 y CD40. Previamente, nuestro grupo comprobó la presencia de ácido siálico en los fragmentos Fc comerciales que se usaron en estos ensayos (datos no mostrados). Se observó que la secreción de IL-10 medida por ELISA se redujo significativamente al cultivar linfocitos B activados con cualquiera de los estímulos usados, en presencia de fragmentos Fc agregados (figura 6A). De forma similar, los porcentajes de linfocitos B transicionales productores de IL-10, medidos por FACS, disminuyeron en todas las condiciones de estímulo significativamente al incluir fragmentos Fc agregados a lo cultivos (figura 6B). En la mayoría de los casos, los fragmentos Fc agregados también redujeron la

expresión de IL-10 por otras poblaciones de linfocitos B (figura 8).

A



B

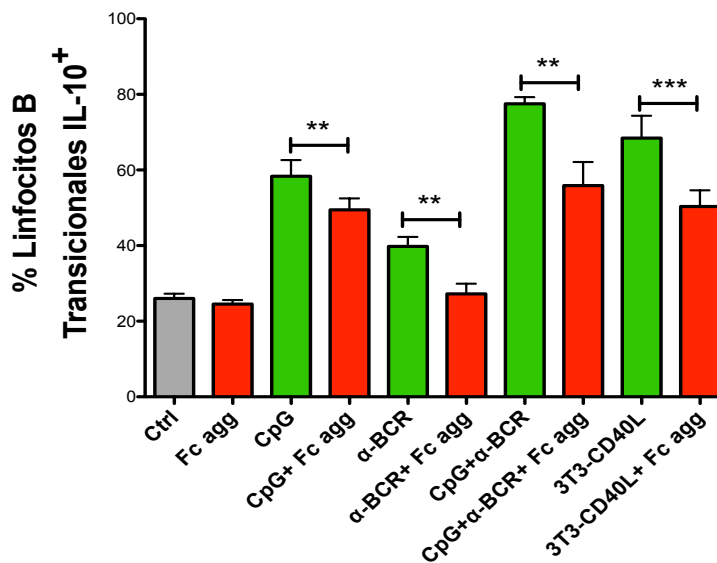


Figura 6: El uso de fragmento cristalizante (Fc) de IgG humana disminuye la expresión y secreción de IL-10 por linfocitos B activados. Linfocitos B cultivados por 48 horas en presencia de 3 ug/mL de CpG, 5 ug/mL de anticuerpos anti-BCR, una combinación ambos, o de la línea celular NIH3T3 que expresa CD40L a razón de 1:10, entre células 3T3-CD40L y células B, en presencia (barra rojas) o ausencia (barra verdes) de fragmentos Fc de IgG agregados por calor (Fc agg) o bien dejados sin estímulo (Ctrl) (barra gris) fueron analizados

para la secreción de IL-10 por ELISA, corregida por el número de células vivas al final del cultivo (A, n=9) y para el porcentaje de células B transicionales que expresan IL-10 mediante FACS (B, n=9). * p <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas.

Siglec 2 y Siglec 10 modulan la secreción y expresión de IL-10 en linfocitos B activados.

Finalmente, para comprobar que el efecto de los fragmentos de Fc agregados sobre la expresión y secreción de IL-10 es mediado por los receptores Siglec 2 y/o Siglec 10, se procedió a bloquear éstos mediante el uso de un receptor soluble para Siglec 2 (sS2) o un anticuerpo bloqueante para Siglec 10 (α S10).

Al evaluar los niveles de IL-10 secretados, se pudo observar que la presencia de los bloqueadores de Siglec 2 y Siglec 10 logra revertir parcial o totalmente la producción de IL-10. En el caso de bloquear Siglec 2 se restauran los niveles de IL-10 secretados al estimular TLR9 y CD40, sin embargo, cuando bloqueamos Siglec 10, los niveles de IL-10 son restaurados, al menos parcialmente, en todos los estímulos (Figura 7).

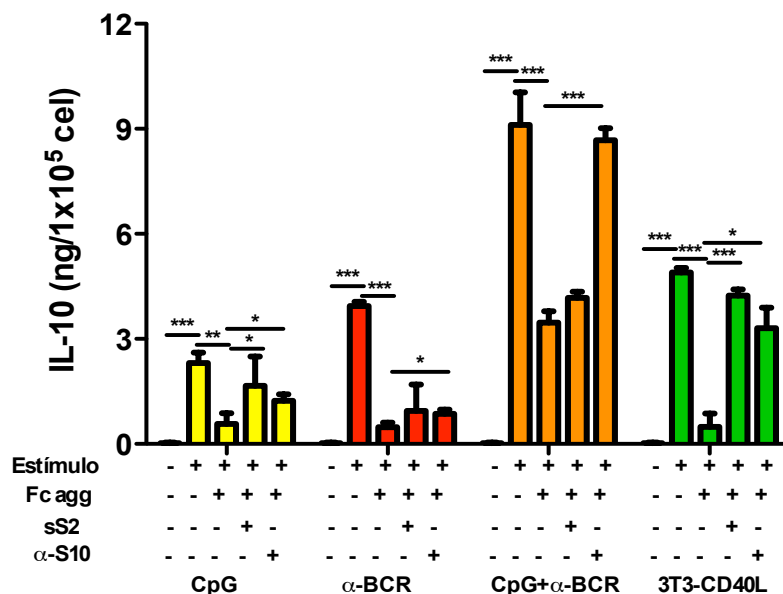


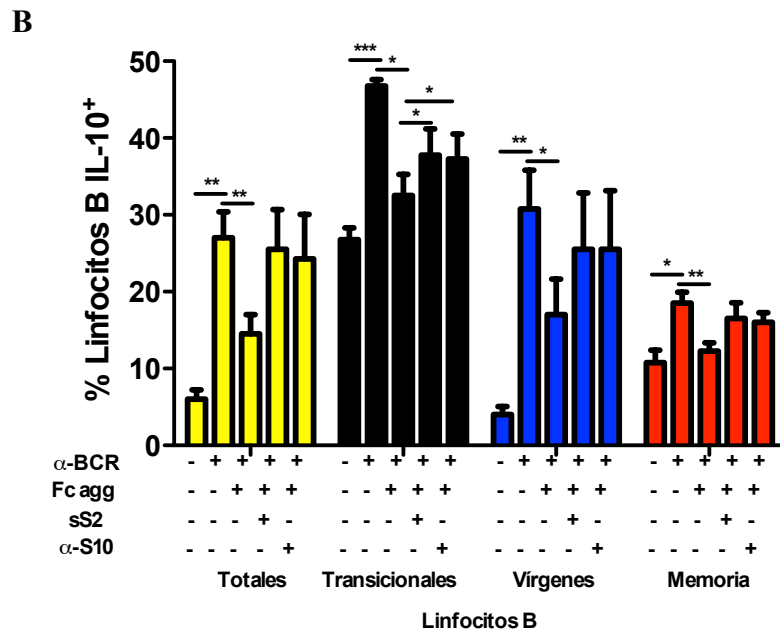
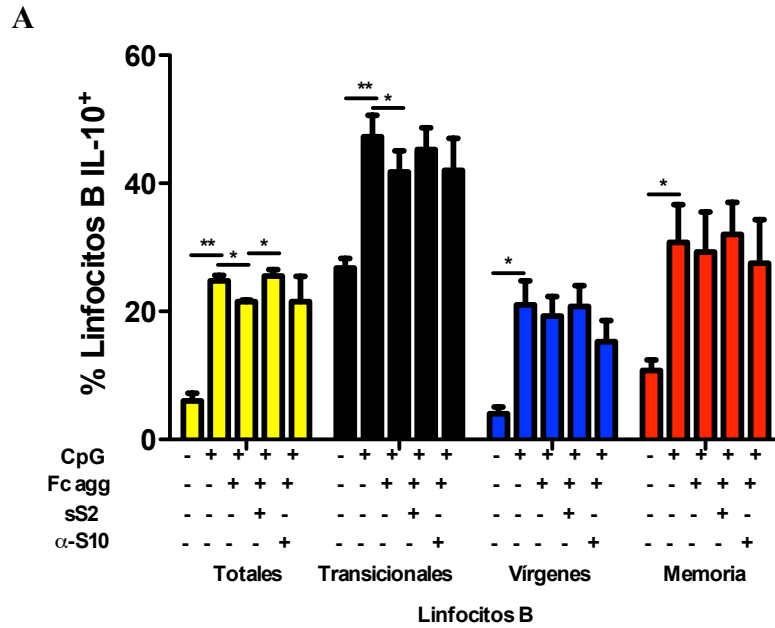
Figura 7: El bloqueo de Siglec 2 y Siglec 10 restaura la secreción de IL-10 por linfocitos B activados y cultivados en presencia de fragmentos Fc de IgG agregados por calor.

Linfocitos B cultivados por 48 horas con CpG, anticuerpos anti-BCR (α -BCR), una combinación de ellos, o en co-cultivo con la línea celular NIH3T3 que expresa CD40L, fueron analizados para la secreción de IL-10 por ELISA en presencia o ausencia de fragmentos Fc de IgG agregados por calor (Fc agg), del receptor Siglec 2 soluble (sS2) o de un anticuerpo anti-Siglec 10 (α -S10). El valor secretado de IL-10 fue corregido por el número de células vivas al final del cultivo. n=4. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas.

Por otra parte, cuando se analizaron los porcentajes de células B totales productoras de IL-10 por FACS, los resultados son similares a aquellos obtenidos en el ELISA, vale decir, que los linfocitos B activados con CD40L o anti-BCR más CpG en presencia de fragmentos Fc agregados recuperan la producción de IL-10 al bloquearse Siglec 2 o Siglec 10 (figuras 8C y 8D). El análisis de la población transicional en cambio muestra que la expresión de IL-10 inhibida por fragmentos Fc agregados se recupera al bloquear tanto Siglec 2 como Siglec 10 en linfocitos B activados vía BCR y CD40, una tendencia que también se observa en el estímulo con anti-BCR y CpG combinados (figuras 8B, 8C y 8D). En las poblaciones virgen y de memoria la expresión de IL-10 sólo se recupera al bloquear Siglec 2 y Siglec 10 cuándo éstas son activadas con CD40L (figura 8D).

En síntesis, estos resultados prueban que la acción inhibitoria de los fragmentos Fc de IgG agregados sobre la producción de IL-10 por linfocitos B es mediada, al menos

parcialmente y principalmente en la población de linfocitos B transicionales, por los receptores de ácido siálico Siglec 2 y Siglec 10.



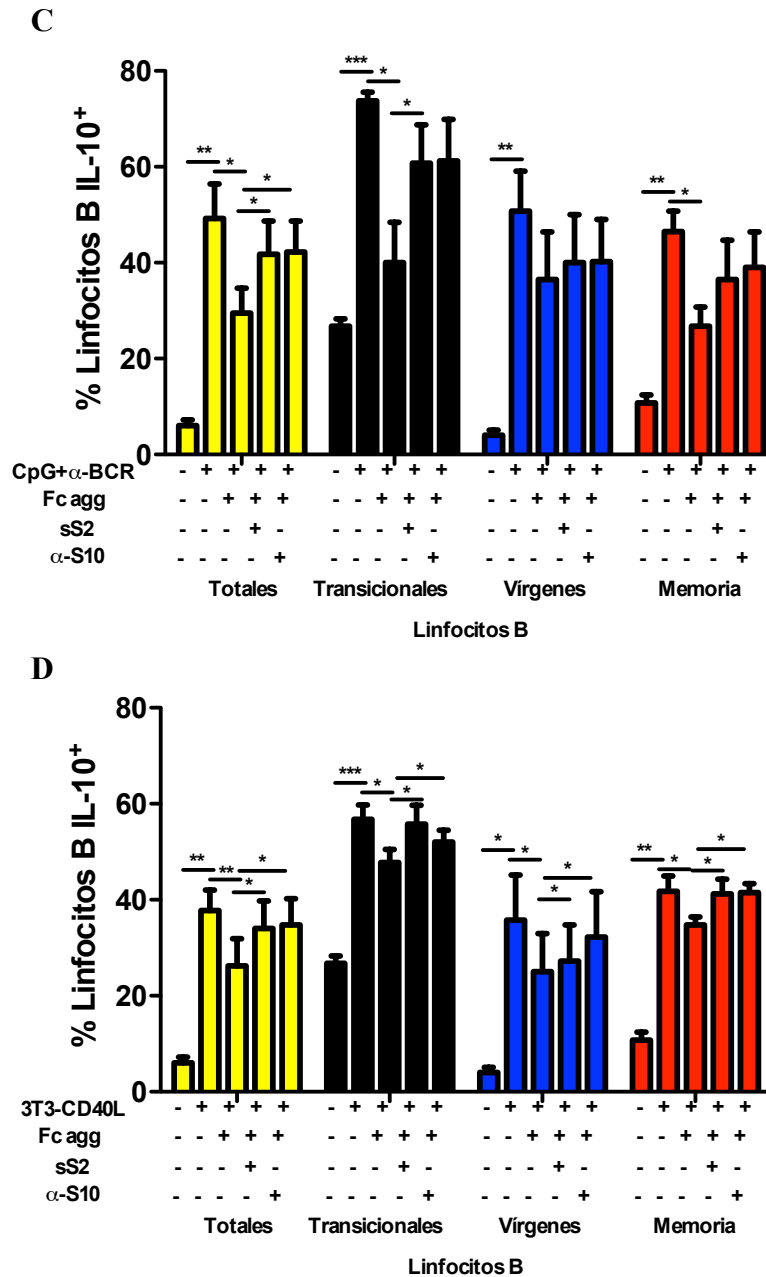


Figura 8: El bloqueo de Siglec 2 y Siglec 10 restaura el porcentaje de células productoras de IL-10 en linfocitos B transicionales activados y cultivados en presencia de fragmentos Fc de IgG agregados por calor. Linfocitos B cultivados por 48 horas con CpG (A), anticuerpos anti-BCR (α -BCR) (B), una combinación de ellos (C), o en co-cultivo con la línea celular NIH3T3 que expresa CD40L (D), fueron analizados para determinar el porcentaje de

células productoras de IL-10 por FACS, en presencia o ausencia de fragmentos Fc de IgG agregados por calor (Fc agg), el receptor Siglec 2soluble (sS2) o un anticuerpo anti-Siglec 10 (α -S10). n=6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas.

DISCUSIÓN

Se ha descrito que linfocitos B humanos expresan 2 receptores que unen ácido siálico, Siglec 2 (CD22) y Siglec 10, los que tienen funciones inhibitorias (Jellusova y Nitschke, 2012). Su expresión comienza desde el desarrollo de linfocitos B en médula ósea y a medida que estos van madurando la expresión aumenta (Stoddart *et al.*, 1997) decayendo en células plasmáticas (Terstappen *et al.*, 1990). Pocos antecedentes existen sobre la expresión de estos receptores en poblaciones vírgenes, de memoria y transicionales. Esta última subpoblación ha sido descrita como aquella en la que se encuentran enriquecidos los linfocitos B productores de IL-10, o Bregs (Bouaziz *et al.*, 2010).

Nuestros resultados muestran que la expresión de Siglec 2 es mayor en las poblaciones transicional y virgen, en relación a la población de memoria. Nuestra evidencia está en línea con lo publicado por Daridon y colaboradores, quienes mediante el uso de CD27, un marcador de linfocitos B de memoria, describen que la expresión de Siglec 2 es menor en la población de memoria (CD27+) comparada con las poblaciones transicional y virgen (CD27-) en sangre periférica (Daridon *et al.*, 2010). En cuanto a Siglec 10, no ha sido descrita su expresión en poblaciones de linfocitos B humanos, por lo que este trabajo es el primer reporte que muestra una alta expresión en poblaciones de memoria por sobre las poblaciones transicional y virgen. En síntesis, se puede aseverar que ambos receptores poseen un comportamiento diferente en cuanto a su expresión en distintas subpoblaciones de linfocitos B humanos en reposo.

Cuando se analizó la expresión de Siglec 2 y Siglec 10 en linfocitos B humanos activados a través de sus receptores BCR, TLR9 y CD40, nuestros resultados muestran que mediante el estímulo con CpG, anti-BCR y CpG más anti-BCR en conjunto, la expresión de Siglec 2 aumenta significativamente a las 48 horas de cultivo. Esta diferencia significativa no se pudo apreciar tan claramente mediante la estimulación con la línea celular que sobreexpresa

CD40L, a diferencia de lo que ocurre con Siglec 10. Al respecto, un estudio en ratones mostró que la expresión de CD22 en poblaciones B-1, linfocitos B presentes en la cavidad peritoneal, disminuye frente a la activación con LPS o CpG, y apenas varía frente a la activación del BCR. En cambio, en poblaciones B-2, linfocitos B presentes en el bazo, la expresión de CD22 aumenta después de la activación con LPS y anti-CD40, pero disminuye frente al estímulo del BCR (Lajaunias *et al.*, 2002). Otro estudio en ratones indica que la expresión de CD22 en linfocitos B disminuye frente a la activación con LPS o la estimulación del BCR (Stoddart *et al.*, 1997). Nuestros resultados no son del todo concordantes con lo que sucede en ratones, pero debemos asumir que en humanos las respuestas pueden ser distintas.

Por otro lado, uno podría especular que el aumento en la expresión de estos receptores frente a la activación con CpG y anticuerpos anti-BCR, podría deberse a un mecanismo de regulación de los linfocitos B frente a una sobre-activación, por ejemplo, durante una respuesta inmune en curso. En otros receptores inhibitorios de linfocitos B se ha descrito el efecto contrario, ya que la activación del BCR o del CD40 reduce los niveles de expresión de Fc γ RIIb, por lo que este tipo de mecanismos compensatorios dependería del tipo de molécula en cuestión (Zhang *et al.*, 2013). El aumento de receptores Siglec 2 y Siglec 10 tras la activación de linfocitos B podría además ayudar a prevenir una respuesta inmune exacerbada que conlleve a una desregulación en la producción de autoanticuerpos. Esto es precisamente lo que ocurre en ratones deficientes para Siglec 2 y/o Siglec G, los que desarrollan severas enfermedades autoinmunes (O'Keefe *et al.*, 1996; O'Keefe *et al.*, 1999; Jellusova *et al.*, 2010b).

Adicionalmente pudimos observar que la expresión de ambos receptores es considerablemente mayor en muestras frescas de linfocitos B en comparación con aquellas

analizadas luego de un cultivo por más de 24 horas. Esta disminución en la expresión se debe a que hay un menor número de receptores en la membrana lo que evidenciaría una pérdida del receptor o un tráfico hacia el interior de la célula. Se ha demostrado que CD22 en linfocitos B humanos está asociado a clatrin, proteínas involucradas en la endocitosis de moléculas, por lo que su transporte al interior de la célula se basa en un mecanismo dependiente de clatrina vía endosomal hacia el aparato de Golgi (Jhon *et al.*, 2003). Los dominios basados en tirosina de CD22 contienen un residuo terminal que permite el acoplamiento al complejo adaptador 50 (AP50) que dirige el reclutamiento de los receptores en dominios ricos en clatrina. Se ha demostrado que entre un 60 y 70% CD22 es internalizado cuando linfocitos B son estimulados usando anticuerpos anti-CD22 (Tatento *et al.*, 2007), sin embargo, este proceso sería también constitutivo, teniendo una vida media de degradación de 8 horas (Shan y Press, 1995). Creemos que la menor expresión de Siglec 2 y 10 determinada mediante FACS en linfocitos B en cultivo, comparada con muestras frescas, se debe principalmente a una internalización y degradación de estos receptores en ausencia de factores que estimulen su síntesis *de novo*.

En esta tesis se pudo demostrar que porciones Fc de IgG humana agregadas por calor activan receptores inhibitorios, reduciendo la producción de IL-10 cuando los linfocitos B fueron estimulados a través de sus receptores BCR, TLR9 o CD40. Esto pudo ser corroborado al bloquear la unión de Fc a estos receptores Siglecs, revirtiendo parcialmente y en algunas condiciones, la inhibición en la producción de IL-10. Adicionalmente, una disminución de células B que expresan IL-10, bajo todas las condiciones de estímulo, se apreció principalmente en células B transicionales, en las que están contenidas las células B reguladoras, descritas como las principales productoras de IL-10 (Bouaziz *et al.*, 2010). Creemos que esta disminución significativa se da principalmente porque la porción Fc de IgGs, al poseer zonas ricas en ácido sialico en uniones $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ (Anthony *et al.*, 2008),

sirve como ligando para los receptores Siglec 2 y Siglec 10, los que podrían estar involucrados en inhibir las señales río abajo de las vías de activación de linfocitos B (Seite *et al.*, 2010), como por ejemplo los intermediarios NFκB y STAT3, que han sido descritos como importantes mediadores en la producción de IL-10 (Saraiva *et al.*, 2009; Blair *et al.*, 2010). Particularmente la disminución de la secreción de IL-10 observada cuando se estimuló el receptor TLR9 en linfocitos B, en presencia de fragmentos Fc agregados, está en línea con lo publicado por otros grupos, quienes demostraron que la estimulación de TLR9 en presencia de IVIg (mezcla de IgGs derivadas de sueros humanos) reduce la secreción de IL-10 por linfocitos B humanos (Seite *et al.*, 2011; Kessel *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se utiliza Epratuzumab como agonista de Siglec 2, no se aprecian cambios en la producción de IL-10 en linfocitos B humanos (Fleisher *et al.*, 2015). Estos resultados disímiles se pueden deber a varios factores, como por ejemplo al uso de diferentes ligandos para un mismo Siglec, o bien a la diversidad de receptores para fracciones Fc contenidos en linfocitos B (Pillai *et al.* 2012).

Complementando nuestros resultados, evidenciamos que al agregar fragmentos Fc a los cultivos de linfocitos B, la secreción de TNF disminuye principalmente cuando se estimulan las células con anticuerpos anti-BCR solos, o junto a CpG, sin embargo, la secreción de IL-6 no se ve afectada bajo ninguna condición de estímulo (figura suplementaria 1). Adicionalmente moléculas involucradas en la presentación antigénica como el complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y CD86 no se ven afectadas en presencia de porciones Fc de IgG cuando se estimulan las células con anticuerpos anti-BCR (figura suplementaria 2). Esto indicaría que los receptores Siglecs, u otros receptores inhibitorios, podrían actuar diferencialmente sobre distintas vías de activación de linfocitos B. Las consecuencias netas de esta modulación a nivel funcional deben ser exploradas más adelante.

La actividad de los receptores Siglecs ha sido asociada a las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 (Doody *et al.*, 1995; Whitney *et al.*, 2001). Estas fosfatasas están involucradas en disminuir los niveles de Ca^{+2} citoplasmáticos inducidos principalmente a través de activación del BCR (Nitschke *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 2007), y de esta forma podrían estar involucradas en la inhibición de vías de señalización que inducen la producción de IL-10, lo que concuerda con nuestros resultados, en los que evidenciamos una disminución en la secreción de IL-10 por linfocitos B activados vía BCR en presencia de fragmentos Fc agregados. Sin embargo, al inhibir estas fosfatasas, el grado de recuperación en la capacidad de secretar IL-10 por los linfocitos B es bajo (figura suplementaria 3). Tampoco podemos descartar que otras fosfatasas descritas en interacción con estos receptores, como por ejemplo SHIP-1 (Nitschke, 2005; Poe *et al.*, 2000), puedan contribuir a regular los niveles de IL-10 en linfocitos B. Resultados de nuestro grupo confirmaron que al agregar un inhibidor químico de SHIP-1 (3 α -aminocolestano - 3AC) a los cultivos de linfocitos B estimulados a través del BCR en presencia de fragmentos Fc de IgG agregados, la producción de IL-10 se restituye parcialmente (figura suplementaria 4).

Es importante destacar que el fragmento Fc de IgG puede unirse a varios receptores inhibitorios en linfocitos B, como el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ (CD32b) (Brauweiler y Cambier, 2003) y éste pudiera tener un rol en la inhibición de la secreción de IL-10 por fragmentos Fc. Ensayos de nuestro grupo, en los que se utilizó un anticuerpo bloqueante anti- $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$, demostraron que la disminución en la secreción de IL-10 inducida por fragmentos Fc agregados no depende de su unión a $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ (figura suplementaria 5). Sería importante determinar la participación de otros receptores para anticuerpos y vías de señalización en la acción de fragmentos Fc sobre la secreción de citoquinas en linfocitos B.

En síntesis, estos resultados sugieren que las vías activadas tras la estimulación de los receptores TLR9 y CD40 son las principales vías inhibidas por la acción de los receptores Siglec 2 y/o Siglec 10 en cuanto a la expresión y secreción de IL-10. En tanto, la activación de las células B tras la estimulación del BCR, sería regulada principalmente a través del receptor Siglec 10, pero no por Siglec 2, lo que sugeriría que Siglec 10 tiene un mayor espectro de acción sobre las diferentes vías de activación descritas en la producción de IL-10.

La utilidad de usar fragmentos Fc agregados en nuestro trabajo para activar los receptores Siglec 2 y Siglec 10 permitió una mayor comprensión sobre el rol de estos receptores en la modulación de citoquinas como IL-10, principalmente en linfocitos B transicionales, los que tienen un rol protagónico en la protección de enfermedades autoinunes (Yang *et al.*, 2013). Nuestros resultados generan antecedentes complementarios al entendimiento de cómo las porciones de Fc de IVIg, ricas en ácido silico, modulan las respuestas de linfocitos B cuando estos concentrados de Igs son administrados en forma terapéutica. Si bien las propiedades de IVIg son dependientes de la acción tanto de la región F(ab')₂ como de la porción Fc sobre diferentes células dianas del sistema inmune (Schwab y Nimmerjahn, 2013), su efecto sobre linfocitos B se le atribuye principalmente a la porción Fc y, últimamente, a la interacción que tiene con los receptores inhibitorios de los linfocitos B (Mitrevski *et al.*, 2015). Todos los antecedentes del impacto de IVIg en células B han permitido comprender, en cierto modo, el rol que tienen estas moléculas en enfermedades en las que los linfocitos B son los protagonistas, principalmente por sus atribuciones en la producción de anticuerpos, presentación antigénica y producción de citoquinas, pero cabe destacar que aún falta conocimiento del potencial de IVIg, y principalmente sobre la modulación de linfocitos B por las porciones Fc ricas en ácido siálico. Finalmente, el impacto de estos resultados nos hacen pensar que si los fragmentos Fc agregados modulan el sistema

inmune a través de receptores Siglecs en linfocitos B, podrían ser una alternativa terapéutica al uso de IVIg, como recientemente lo propone el grupo de Bosques, el que promueve el uso de porciones de Fc recombinantes con altas cantidades de ácido siálico como una opción en enfermedades autoinmunes (Whasburn *et al.*, 2015).

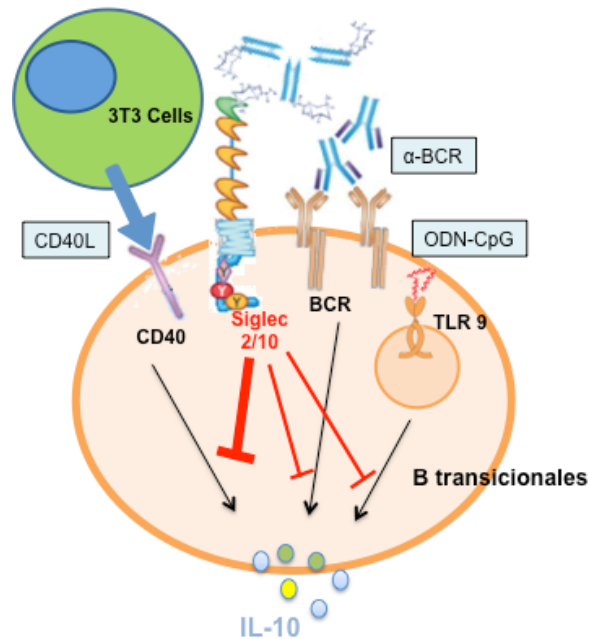


Figura 9: Siglec 2 y Siglec 10 inhiben la producción de IL-10, especialmente aquella activada vía CD40, en linfocitos B transicionales. La presencia de fragmentos Fc, ligandos de Siglec 2 y Siglec 10, inhiben la secreción y expresión de IL-10 en linfocitos B transicionales, activados predominantemente vía CD40.

CONCLUSIONES

1.- Siglec 2 y Siglec 10 se expresan en poblaciones de linfocitos B humanos de memoria, vírgenes y transicionales, tanto en reposo como tras ser activados a través de sus receptores TLR9, BCR y CD40.

2.- La mayor secreción de IL-10 por linfocitos B activados vía TLR9, BCR y CD40 se obtuvo a las 48 horas de cultivo, y los linfocitos B transicionales son los principales responsables de tal producción.

3.- Fragmentos cristalizables de IgG humana agregados por calor disminuyen la secreción y expresión de IL-10 en linfocitos B humanos activados vía TLR9, BCR y CD40.

4.- Los receptores Siglec 2 y Siglec 10 median parcialmente una inhibición de la secreción y expresión de IL-10 en linfocitos B humanos, especialmente cuando éstos son activados a través del receptor CD40.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akira S and Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Rev. Immunol.* 4: 499–511 (2004).
- Angata T and Varki, A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem.Rev.* 102: 439–469 (2002).
- Angata T. Molecular diversity and evolution of the Siglec family of cell-surface lectins. *Mol. Divers.* 10: 555–566 (2006).
- Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, et al. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* 320: 373–376. (2008).
- Arnold, J.N., M.R.Wormald, R.B. Sim, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 21–50 (2007).
- Bandala-Sánchez E, Zhang Y, Reinwald S, Dromey JA, Lee BH, Qian J, Böhmer RM, Harrison LC. T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. *Nat Immunol*: 14(7):741-8 (2013).
- Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, et al. CD19+CD24hiCD38hi. B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 32: 129–140 (2010).
- Bouaziz JD, et al. Human IL-10 producing regulatory B cells control CD4+ T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 40: 2686–2691 (2010).
- Brauweiler, AM, & Cambier, JC. FcγRIIB activation leads to inhibition of signalling by independently ligated receptors. *Biochemical Society Transactions*, 31(1), pp.281–285

(2003).

Brummel R and Lenert P. Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A (D) CpG-oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 174: 2429-2434 (2005).

Buchwald UK, Geerdes-Fenge HF, Vockler J, Ziege S, Lode H. Interleukin-10: effects on phagocytosis and adhesionmolecule expression of granulocytes and monocytes in a comparison with prednisolone. *Eur J Med Res*;4:85–94.4 (1999).

Burdin N, Rousset F, Banchereau J. B-Cell-Derived IL-10: Production and Function. *Methods* 11 (1) 98–111 (1997).

Cao H and Crocker PR. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology* 132: 18–26 (2011).

Carsetti R, Rosado MM, and Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.* 197: 179–191 (2004).

Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, et al. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood*; 85:3577–85 (1995).

Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL- 10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med*; 178:2207–11 (1993).

Chen G-Y, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 Selectively Repress Tissue Damage-Induced Immune Responses. *Science.* 323: 1722–1725 (2009).

Chen J, Mclean PA, Neel BG, Okunade G, Shull GE, and Wortis HH. CD22 attenuates calcium signaling by potentiating plasma membrane calcium-ATPase activity. *Nat.Immunol.* 5: 651–657 (2004).

- Creery WD, Diaz-Mitoma F, Filion L, Kumar A. Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur J Immunol*;26:1273–7 (1996).
- Crocker PR, Paulson JC and Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 255–266 (2007).
- D’Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*;178:1041–8 (1993).
- Dal Porto J, Gauld S, Merrell K, Mills D, Pugh-Bernard A, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.* 41: 599–613 (2004).
- Daridon C, Blassfeld D, Reiter K, Mei HE, Giesecke C, Goldenberg DM, Hansen A, Hostmann A, Frölich D, Dörner T. Epratuzumab targeting of CD22 affects adhesion molecule expression and migration of B-cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 12(6):R204 (2010).
- De Grandmont MJ, Racine C, Roy A, Lemieux R, Néron S. IVIg induces the *in vitro* differentiation of human B lymphocytes and the secretion of IgG. *Blood*;101 (8):3065-3073 (2003).
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*;174:1209–20 (1991).
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*;

150:353–60 (1993).

Doody GM, Justement LB, Delibrias CC, Matthews RJ, Lin J, Thomas ML, and Fearon TA. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 269: 242–244 (1995).

Dörner T, Shock A, Goldenberg DM, Lipsky PE. The mechanistic impact of CD22 engagement with epratuzumab on B cell function: Implications for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*;14 (12):1079-86 (2015).

Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 690–702 (2007).

Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 3: 944–50 (2002).

Fiorentino DF, Bond MW, & Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081–2095 (1989).

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O’Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*; 147:3815–22 (1991).

Fleischer V, Sieber J, Fleischer SJ, Shock A, Heine G, Daridon C and Dörner T. Epratuzumab inhibits the production of the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , but not the regulatory cytokine IL-10, by B cells from healthy donors and SLE patients. *Arthritis Research & Therapy* 17:185 (2015).

Fujimoto M, Bradney AP, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. Modulation of B lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD19/CD22 regulatory loop. *Immunity.* 11:191–200 (1999).

Fujimoto M, Kuwano Y, Watanabe R, Asashima N, Nakashima H, et al. B Cell Antigen

- Receptor and CD40 Differentially Regulate CD22 Tyrosine Phosphorylation. *J Immunol.* 176: 873-879 (2006).
- Gantner, F., Hermann, P., Nakashima, K., Matsukawa, S., Sakai, K., and Bacon, K.B. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Immunol.* 33, 1576–1585 (2003).
- Gerlach J, Ghosh S, Jumaa H, Reth M, Wienands J, Chan AC, Nitschke L. B cell defects in SLP65/BLNK-deficient mice can be partially corrected by the absence of CD22, an inhibitory coreceptor for BCR signaling. *Eur J Immunol.* 33: 3418–26 (2003).
- Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, et al. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosomelinked immunodeficiency B cells. *J Exp Med;* 172:1625–31 (1990).
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a longterm antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med;* 184:19–29 (1996).
- Groux H, O’Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature;* 389:737–42 (1997).
- Gürcana HM, Keskinb DB, Sternb JNH, et al. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* 9(1): 10–25 (2009).
- Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zügel U, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 promotes IL-10 production in human B cells. *Eur. J. Immunol.* 38: 2210–2218 (2008).
- Hoffmann A, Kerr S, Jellusova J, Zhang J, Weisel F, et al. Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol.* 8: 695–704 (2007).
- Ishida H. Clinical implication of IL-10 in patients with immune and inflammatory diseases.

- Rinsho Byori; 42:843–52 (1994).
- Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117: 530-541 (2011).
- Jacobi AM, Goldenberg DM, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Dörner T. Differential effects of epratuzumab on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls. *Ann Rheum Dis*;67:450–7 (2008).
- Jassal, R, Jenkins, N, Charlwood, J, Camilleri, P, Jefferis, R, Lund, J. Sialylation of human IgG-Fc carbohydrate by transfected rat α 2,6-sialyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 243– 249 (2001).
- Jellusova J and Nitschke L. Regulation of B cell functions by the sialic acid-binding receptors siglec-G and CD22. *Front Immunol*; 2:96 (2012).
- Jellusova J, Düber S, Gückel E, Binder CJ, Weiss S, Voll R, Nitschke L. Siglec-G regulates B1 cell survival and selection. *J. Immunol.* 185: 3277–3284 (2010a).
- Jellusova, J., Wellmann, U., Amann, K., Winkler, T. H., and Nitschke, L. CD22 x Siglec-G double-deficient mice have massively increased B1 cell numbers and develop systemic autoimmunity. *J. Immunol.* 184, 3618–3627 (2010b).
- John B, Herrin BR, Raman C, Wang YN, Bobbitt KR, Brody BA, Justement LB. The B cell coreceptor CD22 associates with AP50, a clathrin-coated pit adapter protein, via tyrosine-dependent interaction. *J Immunol.* 1;170(7):3534-43 (2003).
- Kaneko Y, Nimmerjahn F and Ravetch JV. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science, New Series*, 313: 5787; 670-673 (2006).
- Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-

- induced arthritis. *J Clin Invest*; 95:2868 (1995).
- Kawasaki N, Rademacher C, Paulson JC. CD22 regulates adaptive and innate immune responses of B cells. *J Innate Immun.* 3:411–419 (2011).
- Kelm, S, Gerlach, J, Brossmer, R, Danzer, C.P, and Nitschke, L. The ligand-binding domain of CD22 is needed for inhibition of the B cell receptor signal, as demonstrated by a novel human CD22-specific inhibitor compound. *J. Exp. Med.*, 195, 1207–1213 (2002).
- Kessel A, Peri R, Haj T, Snir A, Slobodin G, Sabo E, Rosner I, Shoenfeld Y, Toubi E. IVIg attenuates TLR-9 activation in B cells from SLE patients. *J Clin Immunol.* 31(1):30-8 (2011).
- Kivi E, Elima K, Aalto K, Nymalm Y, Auvinen K, et al. Human Siglec-10 can bind to vascular adhesion protein-1 and serves as its substrate. *Blood*, 114: 5385-92 (2009).
- Kotenko SV. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent?. *Cytokine Growth Factor.* 13:223–40 (2002).
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewski K, Muller W. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*; 75:263 (1993).
- Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y. B Cell Signaling and Fate Decision. *Annu. Rev. Immunol.* 28: 21–55 (2010).
- Lajaunias F, Nitschke L, Moll T, Martinez-Soria E, Semac I, Chicheportiche Y, Parkhouse RM, Izui S. Differentially regulated expression and function of CD22 in activated B-1 and B-2 lymphocytes. *J Immunol.* 15;168 (12):6078-83 (2002).
- Law CL, Sidorenko SP, Chandran KA, Zhao Z, et al. CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk, and phospholipase C- γ (1) upon B cell activation. *J. Exp. Med.* 183: 547–560 (1996).

- Lenert P, Brummel R, Field EH, Ashman RF. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *Journal of Clinical Immunology*, 25(1): 29-40 (2005).
- Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest*; 93:424–8 (1994).
- Lin TJ, and Befus AD. Differential regulation of mast cell function by IL-10 and stem cell factor. *J Immunol*. 15;159(8):4015-23 (1997).
- Llorente L, Zou W, Levy Y, et al. Role of interleukin-10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*; 181:839–44 (1995).
- Macauley MS, Crocker PR & Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nature Reviews Immunology* 14, 653–666 (2014).
- Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T & Baba Y. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity* 34, 703-714 (2011).
- Matsushita T and Tedder TF. Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods Mol Biol*. 677: 99-111 (2011).
- Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med*. 197(4): 489-501 (2003).
- Miles K, Heaney J, Sibinska Z. et al. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. *PNAS* 109(3): 887-892 (2012).
- Mitrevski, M., Marrapodi, R., Camponeschi, A., Cavaliere, F. M., Lazzeri, C., Todi, L., & Visentini, M. Intravenous Immunoglobulin and Immunomodulation of B-Cell – in

- vitro and in vivo Effects. *Frontiers in Immunology*, 6, 4 (2015).
- Nihiro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, et al. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood*; 89:1621–8 (1997).
- Nimmerjahn F and Ravetch JV. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol*. 26:513-33. (2008).
- Nitschke L, Carsetti R, Ocker B, Kohler G, and Lamers MC. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr. Biol*. 7:133–143 (1997).
- Nitschke L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. *Immunological Reviews* 230: 128–143 (2009).
- Nitschke L. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol*; 17: 290–7 (2005).
- O’Keefe, T. L., G. T. Williams, S. L. Davies, and M. S. Neuberger. Hy-perresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* 274:798 (1996).
- O’Keefe, T. L., G. T. Williams, F. D. Batista, and M. S. Neuberger. De-ficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J. Exp. Med*. 189:1307 (1999).
- Otipoby KL, Draves KE, and Clark EA. CD22 regulates B cell receptor-mediated signals via two domains that independently recruit Grb2 and SHP-1. *J. Biol. Chem*. 276: 44315–44322 (2001).
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA and Hymowitz SG. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease *Annu. Rev. Immunol*. 29:71–109 (2011).
- Paulson JC, Macauley MS, Kawasaki N. Siglecs as sensors of self in innate and adaptive

- immune responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1253: 37–48 (2012).
- Pillai S, Cariappa A, Pirnie SP. Esterases and autoimmunity: the sialic acid acetyltransferase pathway and the regulation of peripheral B cell tolerance. *Trends Immunol.* 30: 488–493 (2009).
- Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, & Mattoo H. Siglecs and Immune Regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 30:357–92 (2012).
- Poe JC, Fujimoto M, Jansen PJ, Miller AS, Tedder TF. CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc: a pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *J. Biol. Chem.* 275: 17420–17427 (2000).
- Poe JC, Haas KM, Uchida J, Lee Y, Fujimoto M, et al. Severely-impaired B lymphocyte proliferation, survival and induction of the c-Myc:Cullin 1 ubiquitin ligase pathway resulting from CD22 deficiency on the C57BL/6 genetic background. *J Immunol*; 172:2100–2110 (2004).
- Rousset F, Peyrol S, Garcia E, Vezzio N, Andujar M, Grimaud JA, et al. Longterm cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *Int Immunol*; 7:1243–53 (1995).
- Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor* 21(5):331-44 (2010).
- Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system?. *Nat Rev Immunol.*; 13(3):176-89 (2013).
- Saito I, Haruta K, Shimuta M, Inoue H, Sakurai H, Yamada K et al. Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J Immunol*; 162:2488.44 (1999).
- Saraiva M and O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature*

- Reviews Immunology 10: 170-181 (2010).
- Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O'Garra A. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 31: 209–219 (2009).
- Scharenberg AM, Humphries LA, and Rawlings DJ. Calcium signaling and cell-fate choice in B cells. *Nat.Rev.Immunol.* 7: 778–789 (2007).
- Schuetze N, Schoeneberger S, Mueller U, Freudenberg MA, Alber G, Straubinger RK. IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by *Salmonella enteritidis* and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. *Int Immunol*; 17:649–59 (2005).
- Seite JF, Cornec D, Renaudineau Y, Youinou P, Mageed RA, Hillion S. IVIg modulates BCR signaling through CD22 and promotes apoptosis in mature human B lymphocytes. *Blood* 116: 1698–1704 (2010)
- Seite, J. F., Guerrier, T., Cornec, D., Jamin, C., Youinou, P. and Hillion, S., TLR9 responses of B cells are repressed by intravenous immunoglobulin through the recruitment of phosphatase. *J. Autoimmun.* 37: 190–197. (2011)
- Shan D and Press OW. Constitutive endocytosis and degradation of CD22 by human B cells. *J Immunol* 154:4466-75 (1995).
- Shoemaker J, Saraiva M, O'Garra A. GATA-3 directly remodels the IL-10 locus independently of IL-4 in CD4+ T cells. *J. Immunol.* 176: 3470–3479 (2006).
- Sieger N, Fleischer SJ, Mei HE, Reiter K, et al. CD22 Ligation Inhibits Downstream B Cell Receptor Signaling and Ca² Flux Upon Activation. *Arthritis & Rheumatism* 65(3):

- 770–779 (2013).
- Sims, GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 10: 4390–4398 (2005).
- Stoddart A, Ray RJ, Paige CJ. Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM, *International Immunology*, 9(10): 1571–1579 (1997).
- Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature Immunol.* 8: 1363–1371 (2007).
- Takahashi N, Ishii I, Ishihara H, Mori M, et al. Comparative structural study of the N-linked oligosaccharides of human normal and pathological immunoglobulin G. *Biochemistry* 26, 1137 (1987).
- Takanaski S, Nonaka R, Xing Z, O’Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med*; 180:711–5 (1994).
- Tateno H, Li H, Schur MJ, Bovin N, Crocker PR, Wakarchuk WW, Paulson JC. Distinct endocytic mechanisms of CD22 (Siglec-2) and Siglec-F reflect roles in cell signaling and innate immunity. *Mol Cell Biol.* 27(16):5699-710 (2007).
- Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM and Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 76: 1739-1747 (1990).
- Tuscano JM, Engel P, Tedder TF, Kehrl JH. Engagement of the adhesion receptor CD22 triggers a potent stimulatory signal for B cells and blocking CD22/CD22L interactions

- impairs T-cell proliferation. *Blood*; 87: 4723–30 (1996a).
- Tuscano JM, Engel P, Tedder TF, Agarwal A, Kehrl JH. Involvement of p72syk kinase, p53/56lyn kinase and phosphatidyl inositol-3 kinase in signal transduction via the human B lymphocyte antigen CD22. *Eur. J. Immunol.* 26: 1246–1252 (1996b).
- Tuscano JM, Riva A, Toscano SN, Tedder TF, Kehrl JH. CD22 cross-linking generates B-cell antigen receptor-independent signals that activate the JNK/SAPK signaling cascade. *Blood*; 94:1382–92. (1999).
- Van der Merwe P, Crocker P, Vinson M, Barclay A, Schauer R, and Kelm S. Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22. *J Biol Chem*, 271(16): 9273-80 (1996).
- Vinson M, van der Merwe P, Kelm S, et al. Characterization of the sialic acid-binding site in sialoadhesin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 271(16): 9267-72 (1996).
- Washburn N, Schwab I, Ortiz D, Bhatnagar N, Lansing JC, Medeiros A, Tyler S, Mekala D, Cochran E, Sarvaiya H, Garofalo K, Meccariello R, Meador JW 3rd, Rutitzky L, Schultes BC, Ling L, Avery W, Nimmerjahn F, Manning AM, Kaundinya GV, Bosques CJ. Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17;112 (11) (2015).
- Whitney G, Wang S, et al. New siglec family member, siglec-10, is expressed in cell soft he immune system and has signaling properties similar to CD33. *Eur.J.Biochem.* 268: 6083–6096 (2001).
- Wienands J, Freuler F, and Baumann G. Tyrosine-phosphorylated forms of Ig β , CD22, TCR ζ and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk. *Int. Immunol.* 7: 1701–1708 (1995).

- Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, et al. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* ;24:1007–9 (1994).
- Wogensen L, Huang X, Sarvetnick N. Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J Exp Med*; 178:175 (1993).
- Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, et al. A Regulatory B-cell subset with a unique CD1dhi CD5 phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 28(5): 639-650 (2008).
- Yang M, Rui K, Wang S and Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cellular & Molecular Immunology* 10, 122–132 (2013).
- Yi AK, Yoon JG, Krieg AM. Convergence of CpG DNA- and BCR mediated signals at the c-Jun N-terminal kinase and NF-kB activation pathways: regulation by mitogen-activated protein kinases. *International Immunology*, 15(5): 577-591 (2003).
- Zhang X, Burch E, Cai L, So E, Hubbard F, Matteson EL, Strome SE. CD40 mediates downregulation of CD32B on specific memory B cell populations in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 15;190 (12):6015-22 (2013).

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

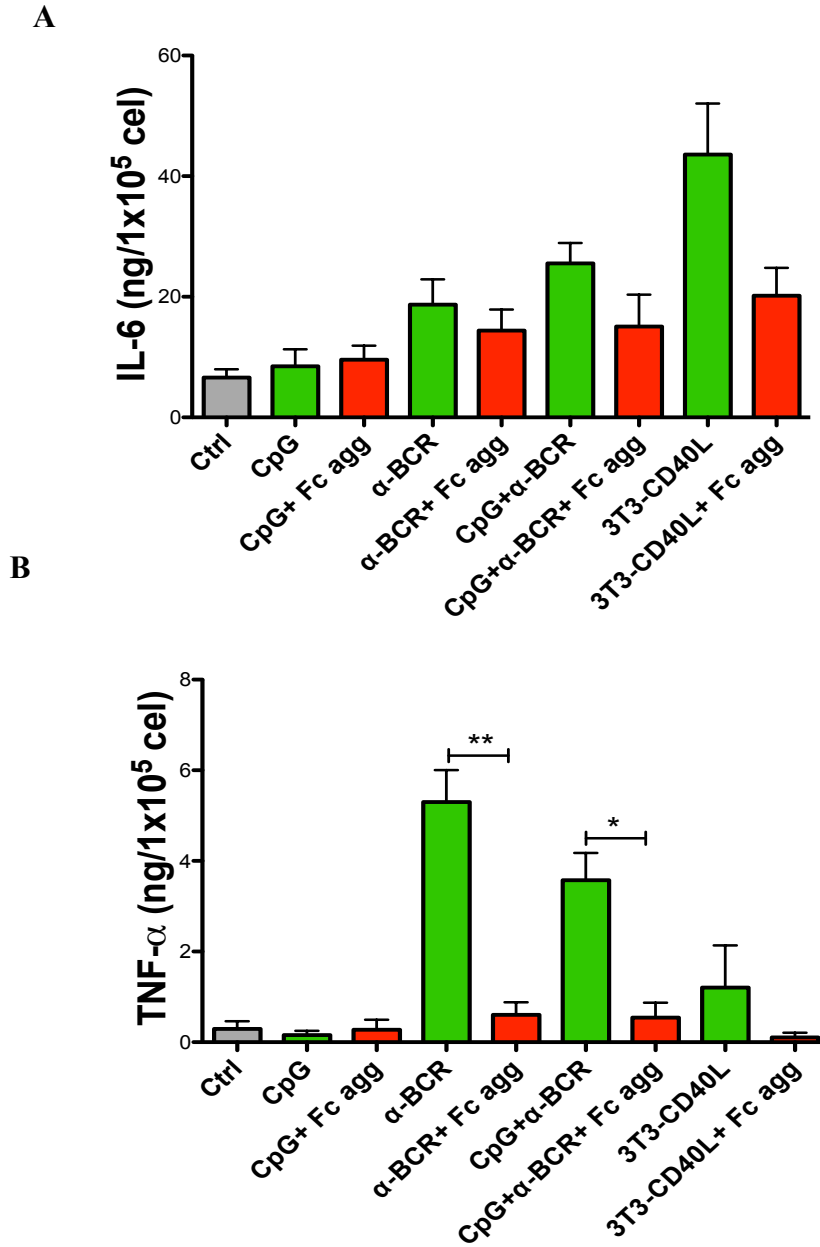


Figura suplementaria 1: El uso de fragmentos Fc de IgG humana agregados por calor disminuye la expresión y secreción de TNF- α pero no de IL-6 por linfocitos B activados. Linfocitos B cultivados por 48 horas en presencia de 3 ug/mL de CpG, 5 ug/mL de anticuerpos anti-BCR, una combinación ambos, o de la línea celular NIH3T3 que expresa

CD40L a razón de 1:10, entre células 3T3-CD40L y células B, en presencia (barra rojas) o ausencia (barra verdes) de fragmentos Fc de IgG agregados por calor (Fc agg) o bien dejados sin estímulo (Ctrl) (barra gris) fueron analizados para la secreción de IL-6 (**A**, n=4) y TNF- α (**B**, n=4) por ELISA, corregida por el número de células vivas al final del cultivo * p <0,05, ** p<0,01, versus Ctrl. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas. Resultados no publicados de la tesis de Magíster de Elianet Fonseca.

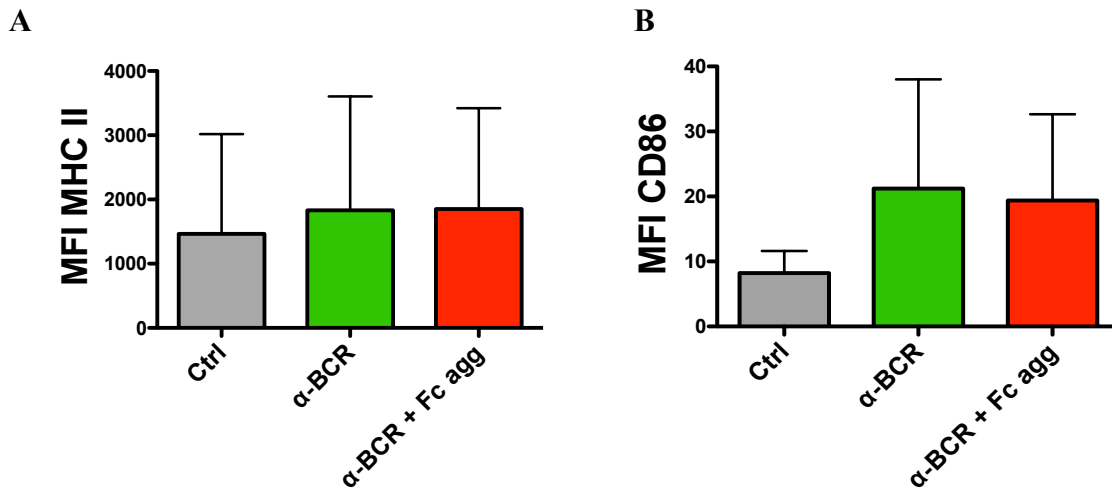


Figura suplementaria 2: La expresión del complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II) y de CD86 en linfocitos B activados vía BCR no varían cuando fragmentos de Fc de IgG humana son agregados al cultivo. Linfocitos B cultivados por 48 horas en presencia de 5 ug/mL de anticuerpos anti-BCR, en presencia o ausencia de fragmentos Fc de IgG agregados por calor (Fc agg) o bien dejados sin estímulo (Ctrl) (barra gris) fueron analizados para la expresión de MHC II (**A**, n=10) y CD86 (**B**, n=10) por FACS. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas. Resultados no publicados de la tesis de Magíster de Elianet Fonseca.

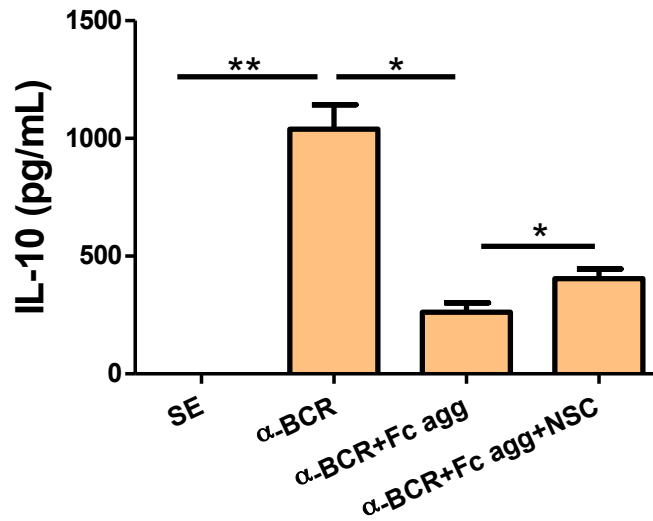


Figura suplementaria 3: Inhibición de SHP-1/2 restituye parcialmente la producción de IL-10 suprimida por fragmentos Fc de IgG agregados, en linfocitos B estimulados a través del BCR. Linfocitos B no estimulados (SE) o activados con un anticuerpos anti-BCR (α -BCR) fueron cultivados en presencia o ausencia de fragmentos Fc agregados por calor (Fc agg) y de un inhibidor de SHP-1 y SHP-2 (NSC). n=4, *p<0,05, **p<0,01. Prueba de Wilconxon. Resultados no publicados de la tesis de pregrado de Ashley Ferrier.

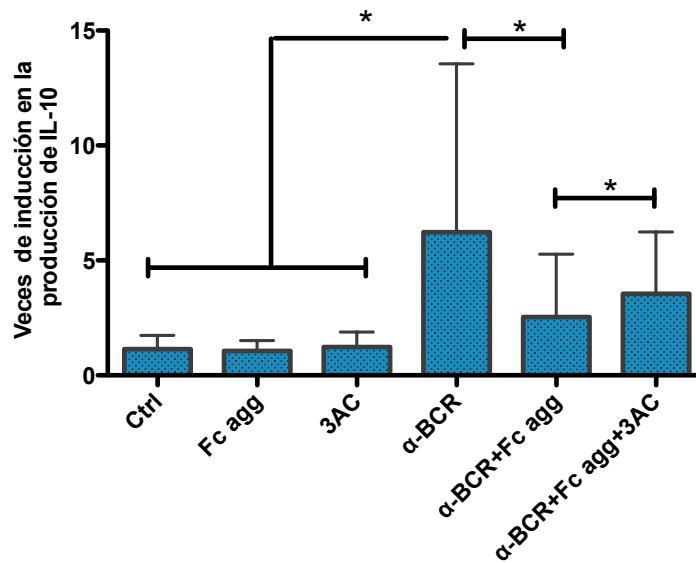


Figura suplementaria 4: Inhibición de SHIP-1 restituye la producción de IL-10 suprimida por fragmentos Fc de IgG agregados, en linfocitos B estimulados a través del BCR. Linfocitos B no estimulados (Ctrl) o activados con anticuerpos anti-BCR (α -BCR) fueron cultivados en presencia o ausencia de fragmentos Fc agregados por calor (Fc agg) y de un inhibidor de SHIP-1 (3AC). La secreción de IL-10 medida por ELISA se expresa como veces de inducción en su producción en relación a las células no estimuladas. $n=7$, $*p<0,05$. Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas. Resultados no publicados de la tesis de pregrado de Ashley Ferrier.

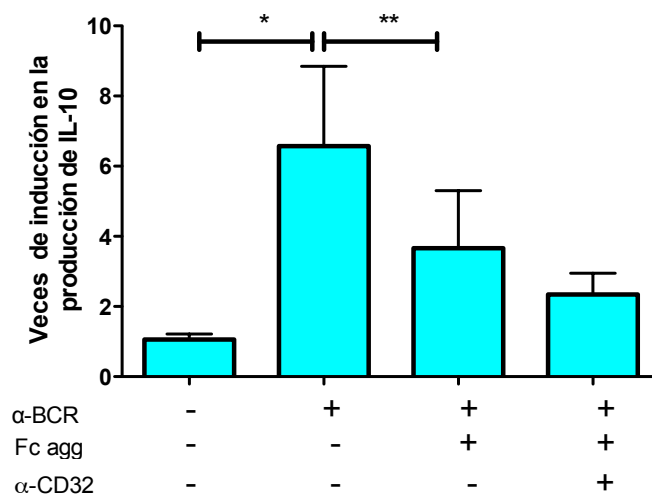


Figura suplementaria 5: Inhibición de FcγIIb no restituye la producción de IL-10 suprimida por fragmentos Fc de IgG agregados, en linfocitos B estimulados a través del BCR. Niveles de IL-10 secretados por linfocitos B estimulados 48 horas mediante anticuerpos anti-BCR (α-BCR), en presencia de fragmentos Fc de IgG agregados (Fc agg) y un fragmento F(ab)² de un anticuerpo bloqueante del receptor FcγIIb (α-CD32). La secreción de IL-10 medida por ELISA se expresa como veces de inducción en su producción en relación a las células no estimuladas (n=11). *p<0,05, **p<0,01 . Prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas. Resultados no publicados de la tesis de pregrado de Ashley Ferrier.

CONSENTIMIENTO INFORMADO



Formulario de Consentimiento Informado para la participación en el estudio

Explorando los mecanismos involucrados en la secreción de IL-10 por linfocitos B reguladores: Implicancias para intervenciones terapéuticas en enfermedades autoinmunes.

Investigador Responsable: Dr. Diego Catalán M.

La Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en conjunto con el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se encuentran realizando un estudio sobre los mecanismos que evitan el desarrollo de enfermedades autoinmunes, que son aquellas enfermedades en que el sistema inmune destruye al propio organismo. A Ud. se le ha invitado a participar en esta investigación como **individuo sano**, al igual que otras 29 personas. El objetivo de este formulario es entregar de forma escrita toda la información que previamente le ha sido transmitida en una conversación con el Investigador Responsable, y que es necesaria para que Ud. decida si desea participar en el estudio.

Mediante la presente investigación, se estudiarán los linfocitos B reguladores, que son células de nuestro sistema inmune capaces de liberar sustancias que nos protegen del desarrollo de enfermedades autoinmunes. A Ud. se le solicitará su autorización para utilizar un producto derivado de su donación de sangre, consistente en un concentrado de leucocitos o glóbulos blancos, los que serán utilizados en experimentos diseñados para los fines de investigación antes descritos. El material biológico extraído será identificado con un código que asegurará su anonimato y se conservará congelado hasta su uso experimental.

Como consecuencia de su participación en este estudio, Ud no experimentará ningún efecto indeseado fuera de aquellos asociados con el procedimiento de donación de sangre, y que ya le fueron explicados por el Tecnólogo Médico Supervisor. Ud. no incurrirá en ningún gasto asociado al desarrollo de este estudio.

Si bien usted no se verá beneficiado directamente de este protocolo, el principal beneficio de su participación es la contribución al conocimiento de las causas de las enfermedades autoinmunes y la exploración de nuevas alternativas de tratamiento para ellas.

Le recordamos que su participación en este estudio es voluntaria, y que la decisión de ingresar a él sólo debe tomarla una vez que haya recibido toda la información que sea necesaria. Ud. podrá retirarse del estudio si así lo desea y podrá solicitar el retiro del material biológico aislado desde sus muestras de sangre, en cualquier momento. Ud tiene derecho a revisar este protocolo con personas de su confianza, y recibirá una copia del documento firmado.

Nosotros registraremos la información derivada de los experimentos realizados a partir de sus muestras. Es posible que esta información sea divulgada en congresos y revistas científicas, siempre manteniendo en reserva la identidad de los individuos participantes. Ud. tiene derecho a recibir toda la información en lo referente a los resultados derivados de su participación en el estudio en forma oportuna, si así Ud. lo solicitase al Investigador Responsable.

Si Ud. tiene cualquier duda sobre los procedimientos u objetivos de este estudio, puede contactar al Investigador Responsable, Dr. Diego Catalán al fono N°: 9786347.

01 AGO. 2012





Si Ud. tiene dudas respecto a sus derechos como persona participante en este estudio, puede tomar contacto con el Presidente del Comité de Ética Científico e Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Dr. Juan Jorge Silva, teléfono N° 9789008, Av. Santos Dumont 999, Independencia, Santiago.

El Sr. Director del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, como autoridad máxima del centro donde se desarrolla la investigación, ha delegado su facultad de firmar a su nombre el presente documento en los funcionarios del Hospital Clínico Sr. Rodrigo González, RUT 12.136.354-2, y Sr. Claudio Pérez, RUT 10.953.262-2, quienes actuarán como ministros de fe del acto de firma del Consentimiento Informado.

Yo, (Nombre del donante),
RUT..... he comprendido totalmente los beneficios e inconvenientes de participar en este programa y acepto voluntariamente participar.

Firma del donante

Nombre, Firma y RUT del Investigador Responsable o Co-Investigador:

Nombre **Firma** **RUT**

Nombre, Firma y RUT del Delegado del Director del Hospital Clínico:

Nombre **Firma** **RUT**

Fecha: _____



01 AGO. 2012



ADDENDUM

A través de la firma de este *addendum* yo, (Nombre del donante), RUT....., doy mi consentimiento para que las muestras donadas producto de mi participación voluntaria en el estudio "Explorando los mecanismos involucrados en la secreción de IL-10 por linfocitos B reguladores: Implicancias para intervenciones terapéuticas en enfermedades autoinmunes" (suscrita anteriormente), se conserven almacenadas para su futura utilización en investigaciones, siempre y cuando los objetivos de éstas estén directamente relacionados con los del estudio antes mencionado.

Firma del donante

Nombre, Firma y RUT del Investigador Responsable o Co-Investigador:

Nombre Firma RUT

Nombre, Firma y RUT del Delegado del Director del Hospital Clínico:

Nombre Firma RUT

Fecha: _____



ACTA DE APROBACIÓN POR COMITÉS DE ÉTICA



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



1/2

ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

28 JUN. 2012

Con fecha 26 junio de 2012, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg. Humanidades, Vicepresidente
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dr. Leandro Biagini A., Médico Internista
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista
Sra. Nina Horwitz C., Sociólogo, Mg. Bioética
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo
Sra. Claudia Marshall F., Representante de la comunidad

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"Explorando los mecanismos involucrados en la secreción de IL-10 por linfocitos B reguladores: Implicancias para intervenciones terapéuticas en enfermedades autoinmunes"** y cuyo investigador responsable es el **Dr. Diego Catalán Martina**, quien desempeña funciones en el **Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Universidad de Chile**.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso*
- *Consentimiento informado*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta de aceptación de las autoridades de la institución en que se realizará el estudio*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl



Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: Población no cautiva, investigación no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Va a permitir avanzar en el conocimiento de la fisiología de los linfocitos B reguladores.
- c) Riesgos y Beneficios: Los riesgos son mínimos, ya que para el proyecto se usará sangre proveniente de donantes de un Banco de Sangre. Los beneficios consisten en el mejor conocimiento de los mecanismos de las Enfermedades Autoinmune.
- d) Protección de los participantes: La protección de los participantes está asegurada por un formulario de Consentimiento Informado redactado de una manera adecuada.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: No aplica para este proyecto.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión original del 15 de junio de 2012, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Santiago, 28 de junio de 2012.



Sra. Mariana Gandlitz H.
Vicepresidenta
Comité de Ética en Investigación
en Seres Humanos

MGH/mva.
c.c.: Archivo Proy. 052-2012

ACTA DE APROBACION N° 32

SANTIAGO, Agosto del 2012.

El Comité Ético Científico para Investigación Biomédica (CECeI) en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Juan Jorge Silva Solís. Médico Cirujano. Presidente.
Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo. Secretaria.
Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Ginecoobstetra.
Dr. Javier Brahm B. Médico Gastroenterólogo.
Dr. Juan Carlos Prieto D. Farmacología Clínica.
Srta. Rina Sepúlveda A. Abogado. ()
Dr. Guillermo Watkins S. Médico Cirujano.
Dra. Gloria López Stewarts. Médico Endocrinólogo. (no asiste)
Dr. Antonio Morales Barría. Médico Gastroenterólogo.
Dra. Teresa Massardo Vega. Médico. Medicina Nuclear.
Prof. Verónica Anguita Mackay. Académico. Facultad de Medicina. (no asiste)

Ha analizado el proyecto denominado: "Explorando los mecanismos involucrados en la secreción de IL-10 por linfocitos B reguladores: Implicancias para intervenciones terapéuticas en enfermedades autoinmunes", cuyo investigador principal es el **Dr. Diego Catalán Martina**, del ICBM Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Para este efecto tuvo a la vista los siguientes documentos:

- Solicitud de evaluación del proyecto de investigación por Comité de Ética.
- Resumen ejecutivo en formulario Fondecyt 2012.
- Consentimiento informado para participación en el estudio.
- Addendum
- Currículo del investigador.

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buenas Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité Ético Científico para Investigación Biomédica en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada:
Donantes de sangre sanos y voluntarios mayores de 18 años de ambos sexos.
- b) Utilidad del Proyecto:
Conocimiento sobre la modulación de la secreción de IL-10 por linfocitos B con funciones reguladoras
- c) Riesgos:

El estudio carece de potenciales riesgos para los donantes reclutados.

d) Beneficios:

Podría mejorar las actuales terapias para enfermedades autoinmunes dirigidas a linfocitos B.

e) Confidencialidad del estudio:

El investigador principal informa que las muestras serán rotuladas con un código.

f) Notificación oportuna de reacciones adversas:

El estudio no involucra reacciones adversas.

g) El investigador responsable se compromete a comunicar el resultado del estudio.

h) El investigador responsable se compromete a enviar semestral y/o anual el informe del estudio.

Por lo tanto el Comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

El investigador dio respuesta a los alcances solicitados.

Se aprueba el formulario de Consentimiento Informado y el Addendum, que se adjuntan firmados, timbrados y fechados por el CECeI.

- Se adjunta nómina de los integrantes del Comité.
- Se adjunta Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, el **01 de Agosto del 2012 y por un tiempo de un año.**





Systemic sclerosis patients present alterations in the expression of molecules involved in B-cell regulation

Lilian Soto^{1,2*}, Ashley Ferrier^{1,2}, Octavio Aravena^{1,2}, Elianet Fonseca^{1,2}, Jorge Berendsen^{1,2}, Andrea Biere², Daniel Bueno², Verónica Ramos^{1,2}, Juan Carlos Aguilón^{1,2} and Diego Catalán^{1,2*}

¹Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile, ²Hospital Clínico, Universidad de Chile, Santiago, Chile, ³Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy, Santiago, Chile

OPEN ACCESS

Edited by:

Daniel Hawiger,
Saint Louis University, USA

Reviewed by:

Wenxia Song,
University of Maryland, USA
Matthew Cook,
Australian National University,
Australia

*Correspondence:

Lilian Soto and
Diego Catalán,
Programa Disciplinario de
Inmunología, Instituto de Ciencias
Biomédicas, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile,
Avenida Independencia 1027,
Santiago 8380453, Chile
sotolan@gmail.com
dcatalan@med.uchile.cl

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance, a
section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 02 July 2015

Accepted: 14 September 2015

Published: 29 September 2015

Citation:

Soto L, Ferrier A, Aravena O,
Fonseca E, Berendsen J, Biere A,
Bueno D, Ramos V, Aguilón JC and
Catalán D (2015) Systemic sclerosis
patients present alterations in the
expression of molecules involved in
B-cell regulation.
Front. Immunol. 6:496.
doi: 10.3389/fimmu.2015.00496

The activation threshold of B cells is tightly regulated by an array of inhibitory and activator receptors in such a way that disturbances in their expression can lead to the appearance of autoimmunity. The aim of this study was to evaluate the expression of activating and inhibitory molecules involved in the modulation of B cell functions in transitional, naive, and memory B-cell subpopulations from systemic sclerosis patients. To achieve this, blood samples were drawn from 31 systemic sclerosis patients and 53 healthy individuals. Surface expression of CD86, MHC II, CD19, CD21, CD40, CD22, Siglec 10, CD35, and FcγRIIB was determined by flow cytometry. IL-10 production was evaluated by intracellular flow cytometry from isolated B cells. Soluble IL-6 and IL-10 levels were measured by ELISA from supernatants of stimulated B cells. Systemic sclerosis patients exhibit an increased frequency of transitional and naive B cells related to memory B cells compared with healthy controls. Transitional and naive B cells from patients express higher levels of CD86 and FcγRIIB than healthy donors. Also, B cells from patients show high expression of CD19 and CD40, whereas memory cells from systemic sclerosis patients show reduced expression of CD35. CD19 and CD35 expression levels associate with different autoantibody profiles. IL-10⁺ B cells and secreted levels of IL-10 were markedly reduced in patients. In conclusion, systemic sclerosis patients show alterations in the expression of molecules involved in B-cell regulation. These abnormalities may be determinant in the B-cell hyperactivation observed in systemic sclerosis.

Keywords: regulatory B cells, systemic sclerosis, IL-10, FcγRIIB, Siglec

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a systemic autoimmune disease characterized by an excessive deposition of extracellular matrix on skin and internal organs, vasculopathy, and the presence of a wide spectrum of autoantibodies. This disease is classified into limited cutaneous (lcSSc) and diffuse cutaneous (dcSSc) according to the degree of skin sclerosis, the presence of interstitial lung disease or pulmonary arterial hypertension, and the autoantibody profile (1). Fibrosis in SSc is produced by

a dysregulated repair process, marked by the differentiation of tissue fibroblasts to myfibroblasts (2). When the gene expression pattern of SSc fibroblasts was compared with that of healthy individuals, no major differences were observed, which suggests that fibrosis could be caused by exogenous stimuli, such as those provided by the immune system (3). In that work, an increase in the expression of B cell-related genes together with an infiltration of CD20⁺ B cells was observed in SSc skin, suggesting a pathogenic role of B cells.

Like most cells of the immune system, B cells express a wide array of activating and inhibitory receptors that modulate their activation status, allowing protective but controlled humoral immune responses. Abnormalities in the expression or function of these receptors on B cells have been reported in murine models of autoimmunity or in patients with autoimmune diseases (4–7). CD19 is a cell-surface signal transduction molecule that forms a complex with CD21, CD81, and CD225. CD21, or complement receptor 2 (CR2), binds to cleavage products of C3 complement component and conveys signals through CD19, thereby lowering the threshold for B-cell activation. CD19 also strengthens signals generated by the B-cell antigen receptor (BCR) and by CD40, which is activated by CD40 ligand (CD40L)-expressing T cells (8–10). Another complement receptor that is expressed on B cells – CD35 (CR1) – has been proposed to deliver inhibitory signals, thus opposing CD21 signals in the regulation of B-cell activation (11).

Fcγ receptor IIB (FcγRIIB) and members of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins (Siglecs) are other inhibitory receptors. FcγRIIB, a low-affinity receptor for the Fc fragment of immunoglobulin G (IgG), conveys inhibitory signals when cross-linked by IgG-containing immune complexes (12). Moreover, Siglecs are a family of immune receptors that recognize sialic acids attached to proteins. B cells express only two of them, CD22 (Siglec 2) and Siglec 10. Upon activation, CD22 recruits phosphatases that dephosphorylate several proteins, such as CD19, thus switching off B-cell activation. Although less studied, Siglec 10 presumably mediates inhibitory signals in a similar way to CD22 (4).

The multidimensional role of B cells in systemic autoimmune diseases has been progressively recognized (13). Increasing evidence suggests that B cells contribute to autoimmune responses by a series of antibody-independent mechanisms, which include antigen presentation to T cells and proinflammatory cytokine secretion (14). More recently, a population of IL-10-producing B cells with the ability to suppress autoimmune responses has been characterized in humans (15). These so-called regulatory B cells, which are enriched within the subpopulation of transitional B cells – immature B cells in transition to secondary lymphoid organs, have been shown to be numerically and/or functionally disturbed in patients with systemic autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) (16, 17).

The present study was aimed at evaluating whether B-cell subpopulations from SSc patients, including transitional B cells, present alterations in frequency, phenotype, and/or expression of activating and inhibitory receptors compared with those from healthy subjects.

Materials and Methods

Study Subjects

Thirty-one patients meeting the American College of Rheumatology criteria for SSc (18) and 53 healthy controls were recruited. The involvement of different systems or organs was evaluated with the Modified Medsger scale (19). Table 1 shows the main clinical and demographic characteristics of both groups. Blood samples (50 ml) were drawn by venous puncture for B-cell phenotyping. Due to the limited amount of sample, only some parameters could be assessed for each individual. For the expression levels of CD86, CD40, major histocompatibility class II (MHC II) molecules, CD35, CD21, CD22, and Siglec 10 on B cells, sex- and age-matched SSc patients and healthy controls groups were compared. The study was approved by the Ethical Committees of the Hospital Clínico and Facultad de Medicina, Universidad de Chile, and all subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

B-Cell Phenotyping

We characterized B cells using the following monoclonal anti-human antibodies: anti-CD19 FITC, CD19 Alexa Fluor 700, CD24 PE-Cy7, CD38 APC, CD27 APC, CD86 PE-Cy5, CD25

TABLE 1 | Main demographic and clinical characteristics of the systemic sclerosis patients and healthy controls recruited for this study.

Characteristics	Patients (n = 31)	Controls (n = 53)
Female/male	23/8	28/25
Age	49.3 ± 11.8	40.0 ± 13.7
Disease duration, months (mean ± SD)	102.2 ± 107.2	—
lcSSc/dcSSc	22/9	—
Rodnan score (mean ± SD)	13.9 ± 6.0	—
ANA positivity, n (%)	31 (100)	—
ANA pattern, n (%)	—	—
Speckled	10 (32.3)	—
Nucleolar	8 (25.8)	—
Homogeneous	9 (29.0)	—
Centromere	14 (45.2)	—
Anti-Scl-70 positivity, n (%)	6 (19.4)	—
Organ involvement, n (%)	—	—
Peripheral vasculature	16 (51.6)	—
Skin	29 (93.5)	—
Gastrointestinal tract	27 (87.1)	—
Lung	21 (67.7)	—
Heart	16 (51.6)	—
Kidney	4 (12.9)	—
Therapy	—	—
Prednisone	3/31	—
Azathioprine + prednisone	2/31	—
Methotrexate	3/31	—
o-phenyllamine	1/31	—
Methotrexate + o-phenyllamine	1/31	—
Methotrexate + o-phenyllamine + prednisone	1/31	—
Hydroxychloroquine	4/31	—
Methotrexate + hydroxychloroquine	1/31	—
Only symptomatic treatment	15/31	—

SD, standard deviation; lcSSc, limited cutaneous systemic sclerosis; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis; ANA, antinuclear antibodies.

¹Some patients have more than one pattern.

²Defined as a Modified Medsger scale value ≥1.

PE-Cy7, CD1d PE, CD21 PE, CD22 PE, CD35 PE, Siglec 10 PE (Biolegend, USA), CD40 FITC, IL-10 PE, MHC II APC eFluor 780 (eBioscience, USA), and FcγRII PE (clone 7.3; Fitzgerald Industries International, USA). For the cell surface staining procedure, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from blood samples by density gradient centrifugation with Lymphoprep (Stemcell Technologies, Canada) and either stained freshly or cryopreserved in liquid nitrogen until use. Cells were incubated with fluorochrome-labeled antibodies for 30 min at 4°C, washed, and fixed before acquisition on a FACSCalibur or FACSria III flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed with FloJo 7.6 Software (USA).

For cytokine production assays, untouched B cells were isolated from whole blood (EasySep, Stemcell Technologies) and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, Thermo Scientific, USA) at 1×10^6 cells/ml in 96-well plates with 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1 μg/ml ionomycin (Sigma-Aldrich, USA), and 1 μg/ml brefeldin A (eBioscience) for 5 h at 37°C and 5% CO₂. For intracellular detection of IL-10 production on B-cell subpopulations, cells were stained with anti-CD19, anti-CD38, and anti-CD24 antibodies, fixed and permeabilized with Permeabilization Buffer (eBioscience), and incubated with an anti-IL-10 antibody for flow cytometry analysis. Fluorescence minus one (FMO) staining controls were used to exclude non-specific background staining. Culture supernatants were collected for detection of IL-10 and IL-6 levels by ELISA (eBioscience).

Statistical Analyses

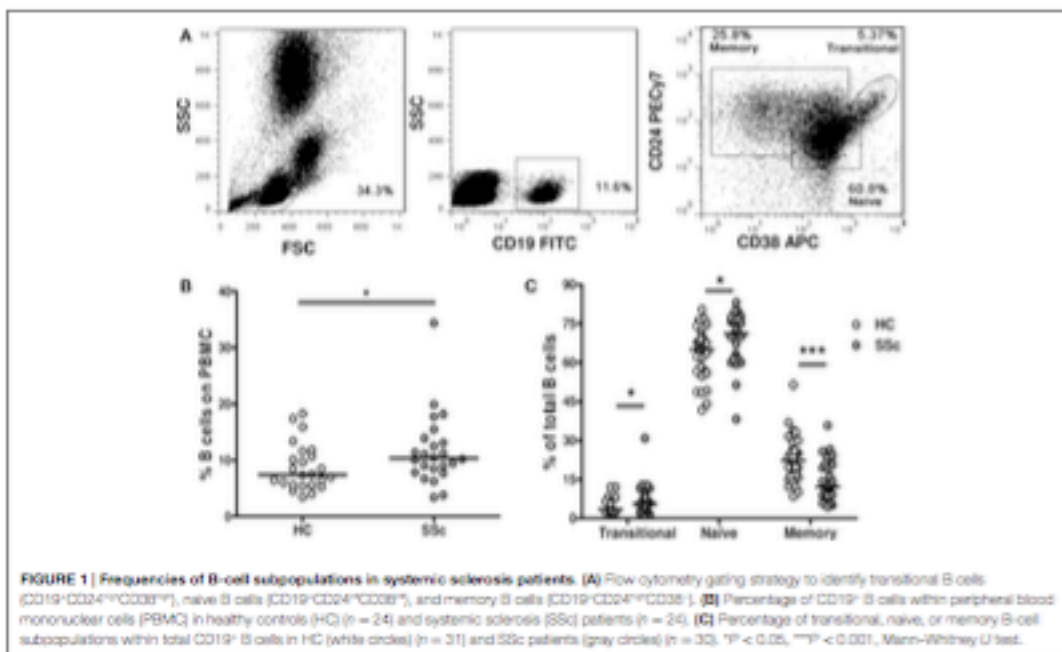
All the study variables were tested for normal distribution with the D'Agostino-Pearson omnibus test. Differences between SSc patients and healthy control groups, or between groups of patients, were analyzed using the two-tailed unpaired Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test, when appropriate. For matched groups, the two-tailed paired Student's *t*-test or Wilcoxon signed-rank test were used, when appropriate. To examine the relationship between continuous variables, linear regression analyses were performed. For statistic analyses and graphics, Stata 12 and GraphPad Prism 5 softwares were used.

Results

Altered Frequencies of B-Cell Subpopulations in Peripheral Blood of Systemic Sclerosis Patients

To investigate whether the frequency of different B-cell subpopulations is altered in peripheral blood of SSc patients, we analyzed them by flow cytometry. A region was set to define the lymphocytic population according to forward and side scatter patterns. B cells were defined as CD19⁺ cells, and a second region was set for them. Finally, CD24 and CD38 expression was used to discriminate transitional (CD24^{hi}CD38^{lo}) from naive (CD24^{lo}CD38^{hi}) and memory (CD24^{lo}CD38^{lo}) B cells, as previously described (16) (Figure 1A).

An increased percentage of CD19⁺ B cells was found in PBMC of SSc patients compared with healthy controls (Figure 1B). Since the relative frequency of memory B cells was dramatically decreased within SSc patients' B cells, the observed



increase in the percentage of total B cells can be explained by an expansion of naive B cells. Interestingly, the percentage of transitional B cells among total B cells was also increased in the peripheral blood of SSc patients compared with healthy subjects (Figure 1C).

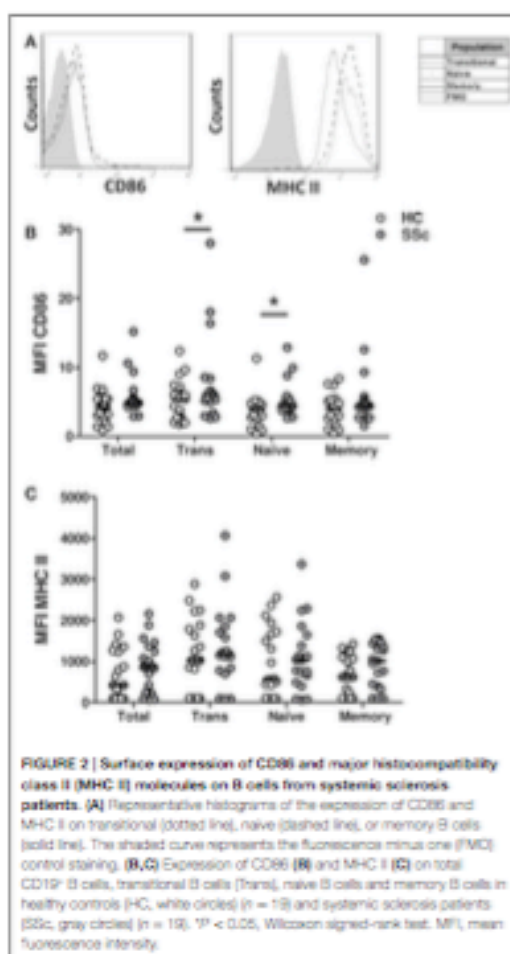
B Cells from Systemic Sclerosis Patients Exhibit an Activated Phenotype

To evaluate whether B cells from SSc patients exhibit an activated phenotype, the surface expression of MHC II and CD86 molecules, involved in antigen presentation and costimulation, respectively, and upregulated upon B-cell activation, was measured (Figure 2). Although very low, the expression of CD86 was elevated in B cells from SSc patients, particularly in the transitional and naive B-cell subpopulations, when compared with healthy subjects (Figure 2B). In contrast, no differences were observed in MHC II expression (Figure 2C).

IL-6 and IL-10 are two B-cell-secreted cytokines that have been involved in the SSc fibrotic process (2). These cytokines were assessed in isolated and stimulated B cells as an estimation of their activation status. No differences were observed in the levels of IL-6 secreted by B cells from SSc patients and healthy controls (Figure 3A). However, SSc patients exhibited a significantly lower IL-10 secretion in comparison to healthy subjects (Figure 3B). To explore which B-cell subpopulation was responsible for this decrease in IL-10 production, intracellular IL-10 expression was evaluated by flow cytometry. The majority of IL-10⁺ cells was found within transitional B cells, both in SSc patients and healthy controls, which is in accordance with previous reports (Figure 3C) (16). Of note, the percentage of IL-10⁺ B cells was reduced in all B-cell subpopulations of SSc patients (Figure 3D). To further characterize this finding, we studied in a subset of seven patients and eight healthy subjects the frequency of CD25^{hi}CD27^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi} B cells, since this population has been described to express high levels of IL-10 (and also TGF- β) and to exhibit strong regulatory properties (20). In accordance with the decreased frequencies of IL-10⁺ B cells, SSc patients presented reduced percentages of CD25^{hi}CD27^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi} B cells compared with healthy controls (Figure 3E).

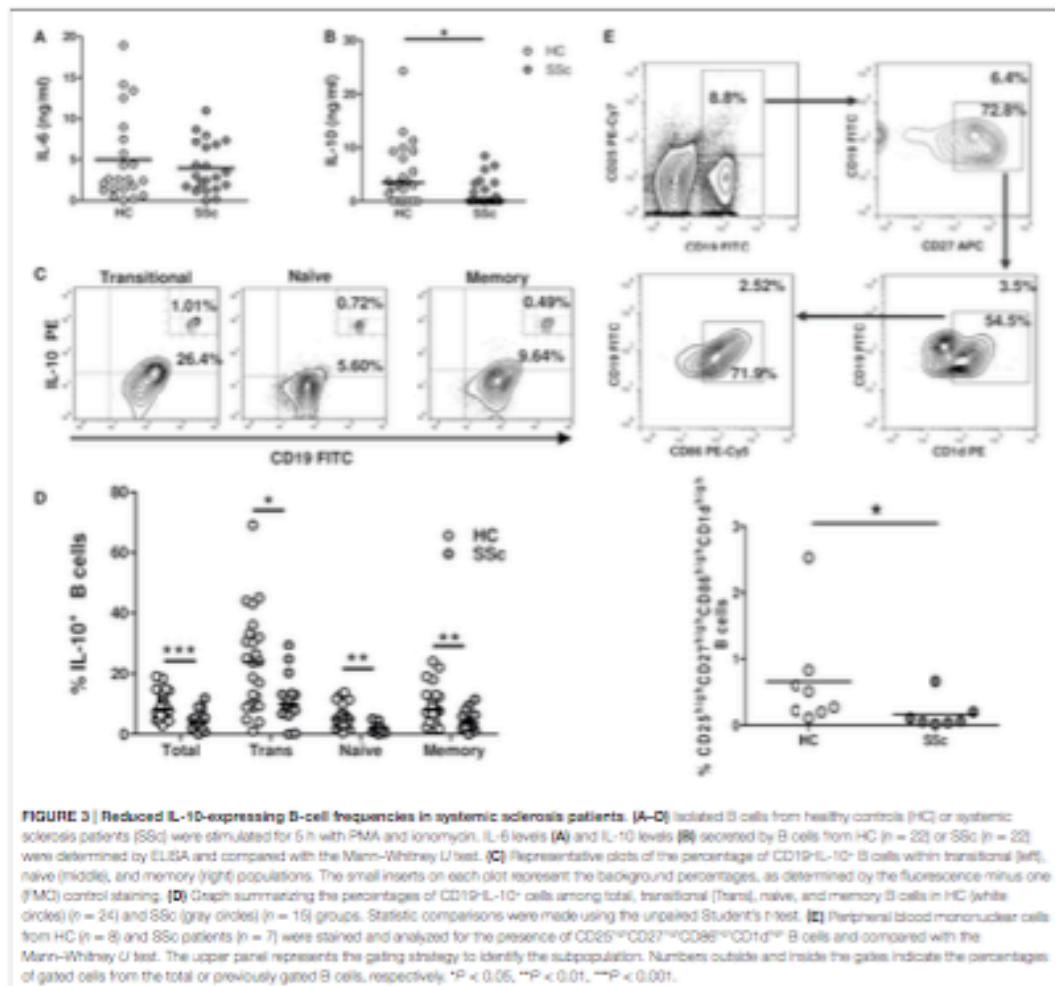
B Cells from Systemic Sclerosis Patients Exhibit a Shift in the Balance of Activating and Inhibitory Receptors

The activated phenotype displayed by B cells from SSc patients could be caused by an overexpression of molecules involved in B-cell activation. To test this possibility, the expression of three molecules that participate in B-cell activation was measured by flow cytometry: CD19, CD21, and CD40. In accordance with previous reports (21), B cells from SSc patients displayed a high expression of CD19 not only in naive and memory subpopulations but also in the transitional subset (Figure 4A). The expression of CD19 on total B cells and on each subpopulation was even higher in a subset of SSc patients with anti-Scl-70 antibodies, which is mainly associated with dcSSc (Figure 4B). In contrast, no differences were observed when comparing CD21 expression on different B-cell subpopulations from SSc patients and healthy controls (Figure 4C). Regarding CD40, increased expression levels were



observed in total B cells as well as in all B-cell subpopulations from SSc patients (Figure 4D).

To find out if a defective expression of inhibitory receptors could be associated with the B-cell hyperactivity observed in SSc patients, the surface expression of CD22, Siglec 10, CD35, and Fc γ RIIB was examined on B cells from SSc patients and healthy subjects. Neither CD22 nor Siglec 10 showed altered expression levels in any of the B-cell subpopulations from SSc patients that were studied (Figures 5A,B). In contrast, SSc patients exhibited lower levels of CD35 expression in CD19⁺ B cells, in particular in the memory compartment (Figure 5C). Moreover, the subset of patients with anticentromere antibodies, which associate with lcSSc, showed an increased expression of CD35 in total B cells and in all subpopulations (Figure 5D). Unexpectedly, Fc γ RIIB expression was found to be significantly increased on naive and transitional B-cell subsets, but not on memory B cells, from SSc patients (Figure 5E).



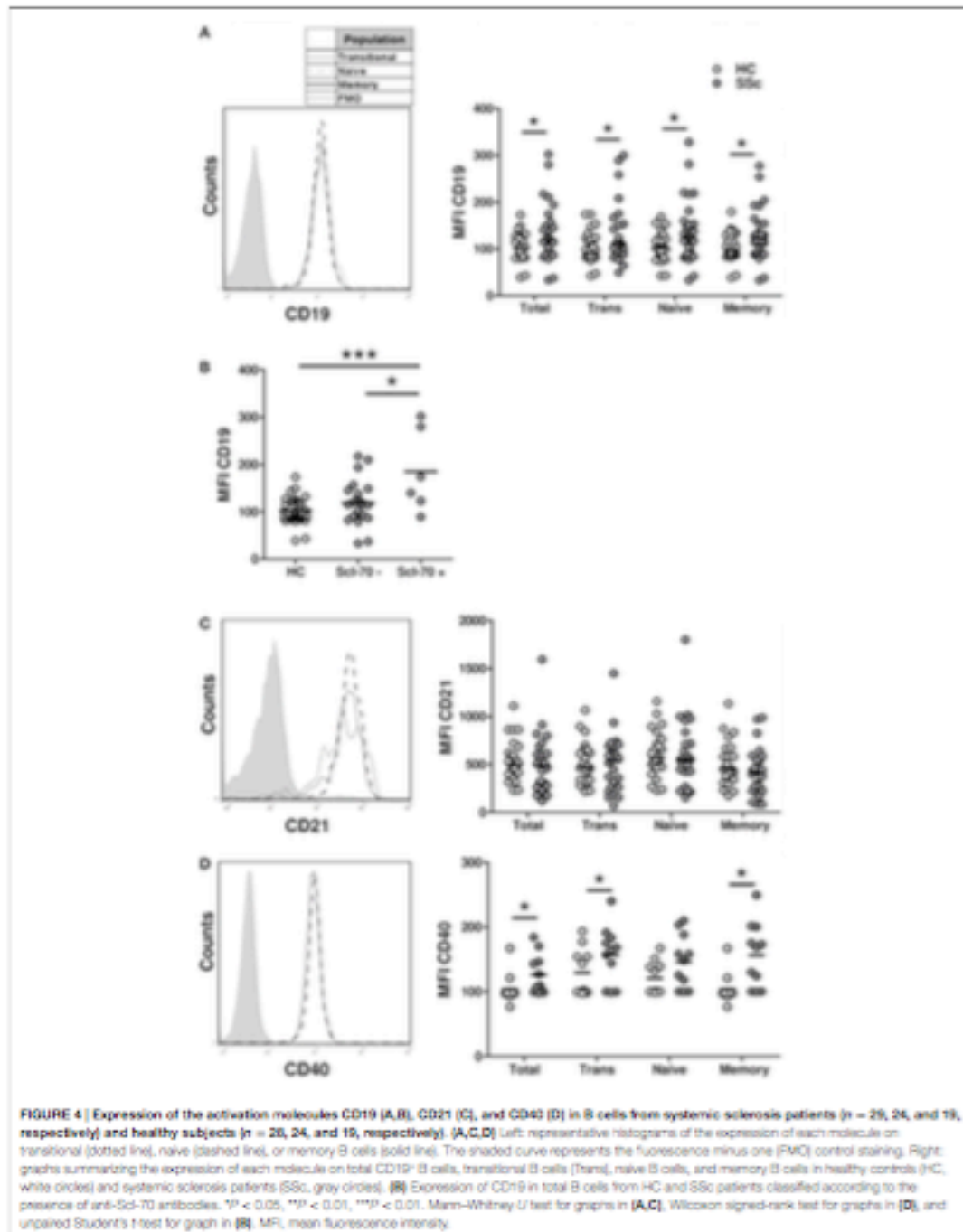
Of interest, patients exhibiting peripheral vascular alterations, as assessed by the Modified Medsger scale, showed a low expression of CD22 and CD35 in total B cells and in all B-cell subpopulations (Figure 6), suggesting a critical role of inhibitory molecules on B cells in the vascular component of this disease.

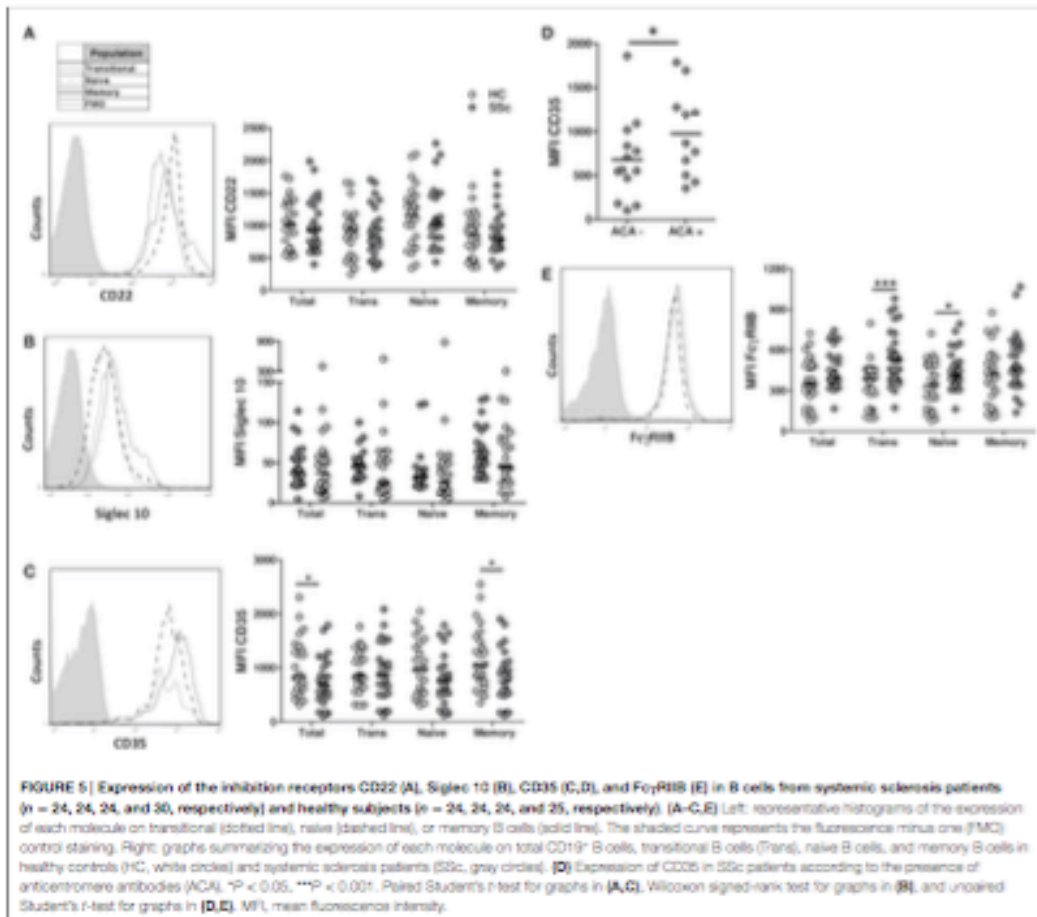
Discussion

In the present study, we found important alterations in the frequency of different B-cell subpopulations and in the balance between activating and inhibitory molecules expressed by these B-cell subsets in SSc patients. SSc patients exhibit a bias in the distribution of B-cell subpopulations toward an increase in the relative frequency of naive cells and a reduction of the memory

compartment. These results, as well as the increase in the percentage of CD19⁺ B cells within PBMC, are in agreement with a previous study in Japanese patients (21). However, this study describes for the first time an increase in the proportion of the transitional B-cell subpopulation in SSc patients. Similar findings have been shown for other autoimmune diseases, such as SLE and primary Sjögren's syndrome (22).

Although it has been suggested that an expansion of immature forms of B cells in these conditions could be caused by failures in early tolerance checkpoints (23), some of these autoreactive transitional B cells could correspond to IL-10-secreting regulatory B cells. Furthermore, we found a reduced percentage of IL-10⁺ B cells in the peripheral blood of SSc patients, not only in the transitional subpopulation but also in memory and naive B



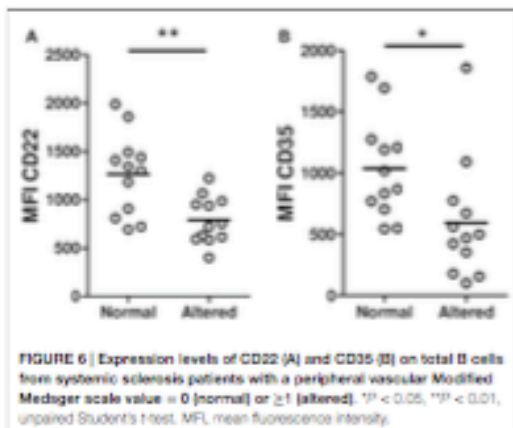


cells. Moreover, SSc patients also exhibited reduced percentages of CD25^{hi}CD27^{hi}CD86^{hi}CD1d^{hi} B cells, a B-cell subpopulation able to suppress CD4⁺ T-cell proliferation (20). Alterations in regulatory B-cell functions have been observed in other autoimmune diseases (16, 17, 24), and SSc may not be an exception; however, functional analysis, such as T-cell responses-inhibition assays, should be performed before drawing such conclusion.

B cells from SSc patients have been reported to present an activated phenotype, which leads to an overproduction of Ig, including autoantibodies, and an active production of cytokines, such as profibrotic IL-6 (25). In the present study, we demonstrated that naive and transitional B cells from SSc patients exhibit an activated phenotype, revealed by an increased expression of CD86 compared with healthy controls. In contrast with previously reported results, this difference was not detected in memory B cells (21). Resting naive B cells have been described to cause an incomplete activation of T cells, in part, due to the lack of expression of CD86, which can

be restored after stimulation (26, 27). Therefore, an upregulation of CD86 on activated naive B cells could contribute to SSc pathogenesis by activating autoreactive T cells, which in turn stimulate the secretion of profibrotic cytokines by fibroblasts (28). In contrast, regulatory B cells expressing markers of transitional B cells are active promoters of tolerance, as they are able to induce regulatory T cells, a function that is largely dependent on CD86 (24). The impact of the increased CD86 expression found in transitional B cells from SSc patients requires further investigation.

The activated phenotype of B cells in SSc has been attributed to an increased expression of the activating molecules CD19 and CD21 (29). In addition, a polymorphism in the CD22 coding gene that is associated with a decreased expression of this receptor on B cells has been reported to be more frequent in a subset of Japanese IeSSc patients (30). Similarly, in the tight skin TSK/+ murine model of SSc, hyperresponsive B cells depend on an exacerbated activity of CD19 and an impaired counterregulation by CD22 (31, 32). In



the results presented herein, an increased expression of CD19 and CD40, but not of CD21, was found in SSc B cells. The differences observed between this study and previous ones, regarding the expression of B-cell surface molecules such as CD40, CD21, and CD86 or the secretion of IL-10 and IL-6 by SSc B cells, could be attributed to different experimental settings or to the composition of the study group, in terms of the proportion of patients presenting lcSSc or dcSSc, as well as the undergoing therapy (21, 29). Indeed, decreased expression of CD40 and augmented levels of CD22 were found in patients receiving steroids (data not shown).

On the other hand, although no differences were found in the expression of CD22 or Siglec 10 on B cells from SSc patients or healthy subjects, a reduced expression of CD35 was detected in memory B cells from SSc patients. A reduced expression of this inhibitory complement receptor has been previously reported for other autoimmune diseases, such as SLE and RA, but never before for SSc (33–35). On human B cells, CD35 inhibits the BCR- and CD40-induced increase in cytoplasmic Ca^{2+} levels, proliferation, and antibody secretion (11, 33). This suggests a role of CD35 as a late checkpoint in preventing the maturation and differentiation of autoreactive B cells, a function that could be altered in autoimmune diseases such as SSc (6). In this sense, it is remarkable to note that in this group of patients, expression levels of molecules involved in the regulation of B-cell activity are associated with different subsets of patients. For instance, patients carrying anti-Scl-70 antibodies, which are characteristic of dcSSc, exhibited high expression levels of CD19 while patients carrying anticentromere antibodies, which are related to lcSSc, showed

increased expression levels of CD35. The immunologic basis of these findings remains obscure for us.

Intriguingly, naive and transitional B cells from SSc patients showed high expression levels of the inhibitory receptor FcγRIIB. Our group and others have described that in autoimmune diseases, such as RA and SLE, B cells exhibit a reduced expression of this receptor in the memory subpopulation, associated to high levels of autoantibodies (34–38). Moreover, the absence of FcγRIIB specifically on B cells predisposes for the development of lupus and arthritis in animal models, highlighting its role as a crucial molecule for the control of autoimmune humoral responses (39). Although circulating human transitional B cells have been initially described to express moderate levels of FcγRIIB, the function of this receptor in transitional B cells remains unknown (22). A more recent publication reports a subpopulation of mouse IL-10-secreting B cells that expresses high levels of FcγRIIB, which endows these cells with the ability for an efficient endocytosis of immune complexes and inhibition of $CD4^{+}$ T-cell responses. The authors postulate that by capturing immune complexes, these FcγRIIB^{hi} B cells may attenuate the activation of immune responses (40). It remains unclear how the increased expression of FcγRIIB on the transitional subpopulation could be involved in the alterations observed in SSc B cells. One possibility is that it may be a compensatory mechanism triggered after the development of an exacerbated humoral response. Another explanation is that FcγRIIB could inhibit IL-10 secretion by transitional B cells after binding autoantibody-containing immune complexes, thus precluding its regulatory functions.

Altogether, this study demonstrates alterations in the frequencies and activation status of different B-cell subpopulations from SSc patients, including for the first time an analysis of the transitional B-cell subpopulation. We are currently carrying out *in vitro* experiments in order to uncover the mechanisms through which these abnormalities affect the function of B cells in this disease as well as key signaling molecules involved.

Funding

This work was supported by FONDECYT-Chile (grant nos. 1121100 and 11121497), REDES 140041 and the Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy P09-016-E.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dr. Katina Schinnerling for critically reviewing the manuscript and Mrs. Nancy Fabres and Mrs. Juana Orellana for their excellent technical assistance.

References

- Gabrieli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* (2009) **360**:1989–2003. doi:10.1056/NEJMra0806188
- Veiga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* (2007) **117**:557–67. doi:10.1172/JCI31139
- Whitfield ML, Finley DR, Murney JL, Troyanskaya OG, Chiffi P, Pergamentshikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:12319–24. doi:10.1073/pnas.163514100
- Muller J, Nitschke L. The role of CD22 and Siglec-G in B-cell tolerance and autoimmune disease. *Nat Rev Rheumatol* (2014) **10**:422–8. doi:10.1038/nrnheum.2014.34
- Smith KG, Clatworthy MR. FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* (2012) **12**:328–43. doi:10.1038/nri2762
- Erdei A, Issek A, Tócsik K, Sándor N, Keresztes M, Pethő L, et al. Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions. *Mol Immunol* (2009) **46**:2767–73. doi:10.1016/j.molimm.2009.05.181

7. Dörner T, Lipsky PE. Signaling pathways in B cells: implications for autoimmunity. *Curr Top Microbiol Immunol* (2008) **305**:213–40. doi:10.1007/978-3-540-29714-6_11
8. Fujimoto M, Poe JC, Hasegawa M, Tedder TF. CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification. *Immunity* (2000) **22**:281–88. doi:10.1086/IR:22:3:3281
9. Mongeluzi FK, Vilesky MA, Light PE, Izman JK. The affinity threshold for human B cell activation via the antigen receptor complex is reduced upon co-ligation of the antigen receptor with CD21 (CR2). *J Immunol* (1997) **159**:3782–91.
10. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiak A, Guo Y, Nardella RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunity* (2009) **229**:152–72. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.022
11. Tsai M, Prachi J, Bajaj Z, Erdel A. Complement receptor type 1 (CR1) modulates inhibitory signals in human B lymphocytes. *J Immunol* (2002) **168**:2782–8. doi:10.4049/jimmunol.168.6.2782
12. Nizenzvahn E, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* (2008) **8**:34–47. doi:10.1038/nri2206
13. Mauri C, Bossa A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* (2012) **30**:221–41. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074934
14. Filippova S. Cytokine-producing B cells as regulators of pathogenic and protective immune responses. *Ann Rheum Dis* (2013) **72**(Suppl 2):i180–4. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202253
15. Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Arth Rheum* (2013) **60**:18–22. doi:10.1016/j.jbspin.2012.04.010
16. Blais PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(lo) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity* (2010) **32**:129–40. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009
17. Flores-Borja F, Bossa A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19 + CD24^{hi}/CD38^{lo} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* (2013) **5**:173ra23. doi:10.1126/scitranslmed.3005407
18. Masi AT. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* (1980) **23**:581–90. doi:10.1002/art.1780230510
19. Medsger TA Jr, Bombardieri S, Czirjak L, Scorza R, Della Rossa A, Bencivelli W. Assessment of disease severity and prognosis. *Clin Exp Rheumatol* (2003) **21**:542–6.
20. Keisel A, Haj T, Peri R, Seir A, Melamed D, Sebo E, et al. Human CD19(+)/CD25(hi) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Astimmunol Rev* (2012) **11**:670–7. doi:10.1016/j.iares.2011.11.018
21. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* (2004) **56**:1918–27. doi:10.1002/art.20274
22. Siens GP, Eitinger B, Shireta Y, Yarboro CH, Hiei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* (2005) **105**:6390–8. doi:10.1182/blood-2004-11-4284
23. Landolfi-Marcicorena C, Wüther R, Reich H, Herzigberg A, Scholey J, Gladstein DD, et al. Increased expression of B cell activation factor supports the abnormal expansion of transitional B cells in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* (2011) **38**:642–51. doi:10.3899/jrheum.100214
24. Lenoise S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* (2011) **36**:228–38. doi:10.1016/j.jaut.2011.01.005
25. Matsubata T, Hasegawa M, Yamaoka K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* (2006) **54**:192–201. doi:10.1002/art.21526
26. Jiang W, Lederman MM, Harding CV, Sieg SF. Presentation of soluble antigens to CD8 + T cells by CpG oligodeoxynucleotide-primed human naive B cells. *J Immunol* (2011) **186**:2880–6. doi:10.4049/jimmunol.1001869
27. Good KL, Avery DT, Tangye SG. Naive human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* (2009) **182**:890–901. doi:10.4049/jimmunol.182.2.890
28. O'Reilly S, Hagle T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology (Oxford)* (2012) **51**:1540–9. doi:10.1093/rheumatology/kes090
29. Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* (2003) **169**:6635–43. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6635
30. Hirono Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, et al. Association of CD22 gene polymorphisms with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens* (2007) **69**:242–9. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.01801.x
31. Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, et al. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* (2002) **109**:1453–62. doi:10.1172/JCI0215078
32. Asano N, Fujimoto M, Yamaoka N, Shirasawa S, Hasegawa M, Okochi H, et al. B lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. *Am J Pathol* (2004) **165**:641–50. doi:10.1016/S0003-9440(10)63328-7
33. Krennlika M, Polgar A, Falog L, Kiss E, Podé G, Bedel A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients. *Int Immunol* (2013) **25**:25–33. doi:10.1093/intimm/dks090
34. Prokopenko KE, Rho JH, Matti P, Lindqvist U, Kleiman S. Down regulation of Fc and complement receptors on B cells in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* (2010) **137**:322–9. doi:10.1016/j.clim.2010.04.006
35. Isak A, Gergely P, Szekeres Z, Prachi J, Podé G, Erdel A, et al. Physiological up-regulation of inhibitory receptors Fc gamma RII and CR1 on memory B cells is lacking in SLE patients. *Int Immunol* (2008) **20**:185–90. doi:10.1093/intimm/dmn132
36. Catalán D, Aravena O, Subago E, Wurmman P, Soto L, Kalergis AM, et al. B cells from rheumatoid arthritis patients show important alterations in the expression of CD86 and Fc gamma RIIb, which are modulated by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Res Ther* (2010) **12**:R68. doi:10.1186/ar2985
37. Su K, Yang H, Li X, Li X, Gibson AW, Cafardi JM, et al. Expression profile of Fc gamma RIIb on leukocytes and its dysregulation in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* (2007) **178**:3272–80. doi:10.4049/jimmunol.178.5.3272
38. Mackay M, Stensvik A, Wang T, Arsenow C, Li M, Koenig S, et al. Selective dysregulation of the Fc gamma RIIb receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med* (2006) **209**:2157–64. doi:10.1084/jem.20051503
39. Brownlie RJ, Lawlor KE, Niederer HA, Carter AJ, Xiang Z, Clatworthy MR, et al. Distinct cell-specific control of autoimmunity and infection by Fc gamma RIIb. *J Exp Med* (2008) **205**:883–95. doi:10.1084/jem.20072565
40. Qiao L, Qian C, Chen Y, Bai Y, Bao Y, Lu L, et al. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi}/Fc gamma RIIb^{hi} regulatory B cells through IFN-beta and CD40L. *Blood* (2012) **120**:581–91. doi:10.1182/blood-2011-08-377242

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Soto, Ferriz, Aravena, Fomera, Berendse, Bier, Baum, Ramos, Aguillón and Catalán. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RESUMEN DE TRABAJOS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

IL-10 secretion on B cells is regulated by Siglec 2 and Siglec 10 receptors. **Berendsen, J.**, Ferrier, A., Aravena, O., Pino-Lagos, K., Aguillón, J.C., Soto, L., Catalán, D. Society for Cell Biology XXVIII Annual Meeting. Puerto Varas-Chile. 26-30 Octubre 2014

Decreased activation-induced TIM+ and IL-10+ B cells in systemic sclerosis patients. Aravena O., Ferrier A., Fonseca E., Vega P., **Berendsen J.**, Pino-Lagos K., Aguillón J.C., Soto L., Catalán D. Society for Cell Biology XXVIII Annual Meeting. Puerto Varas-Chile. 26-30 Octubre 2014

Activated b cells expressing TIM-1 inhibit inflammatory t cell responses and induce Foxp3+ T cells Aravena O., Ferrier A., Fonseca E., Vega P., **Berendsen J.**, Cerda A., Pino-Lagos K., Aguillón J.C., Soto L., Catalán D. Society for Cell Biology XXVIII Annual Meeting. Puerto Varas-Chile. 26-30 Octubre 2014